



<http://portaildoc.univ-lyon1.fr>

Creative commons : Paternité - Pas d'Utilisation Commerciale -
Pas de Modification 2.0 France (CC BY-NC-ND 2.0)



<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/2.0/fr>

UNIVERSITE CLAUDE BERNARD - LYON 1
FACULTE DE PHARMACIE DE LYON
INSTITUT DES SCIENCES PHARMACEUTIQUES ET BIOLOGIQUES

Année 2014

THESE n° 03-2014

**MEMOIRE DU DIPLOME D'ETUDES SPECIALISEES
DE BIOLOGIE MEDICALE**

Travail effectué dans le Laboratoire de Bactériologie – Pr LINA
Centre Hospitalier Lyon Sud - Hospices Civils de Lyon
Sous la direction du Dr Oana DUMITRESCU

présenté et soutenu publiquement le 14 mars 2014 par

Mademoiselle **BERAUD Laetitia**
Née le 23 Novembre 1985 à St Etienne

Conformément aux dispositions du décret n°90810 du 10 septembre 1990, tient lieu de thèse

T H E S E
POUR LE DIPLOME D'ETAT DE DOCTEUR EN PHARMACIE

**ETUDE DE L'INFLUENCE DES ANTIBIOTIQUES A CONCENTRATIONS
SUB-INHIBITRICES SUR L'EXPRESSION DES PSM α CHEZ *STAPHYLOCOCCUS AUREUS***

JURY

Président : Monsieur FRENEY Jean, Professeur des Universités – Praticien Hospitalier

Membres du Jury : Madame DUMITRESCU Oana, Maitre de Conférence des Universités –
Praticien Hospitalier

Monsieur LINA Gérard, Professeur des Universités – Praticien Hospitalier

Monsieur STEGHENS Jean-Paul, Praticien Hospitalier

Monsieur VANDENESCH François, Professeur des Universités –
Praticien Hospitalier

UNIVERSITE CLAUDE BERNARD LYON 1

- Président de l'Université M. François-Noël GILLY
- Vice-Président du Conseil d'Administration M. Hamda BEN HADID
- Vice-Président du Conseil Scientifique M. Germain GILLET
- Vice-Président du conseil des Etudes et de la Vie Universitaire M. Philippe LALLE

Composantes de l'Université Claude Bernard Lyon 1

SANTE

- UFR de Médecine Lyon Est Directeur : M. Jérôme ETIENNE
- UFR de Médecine Lyon Sud Charles Mérieux Directrice : Mme Carole BURILLON
- Institut des Sciences Pharmaceutiques et Biologiques Directrice : Mme Christine VINCIGUERRA
- UFR d'Odontologie Directeur : M. Denis BOURGEOIS
- Institut des Techniques de Réadaptation Directeur : M. Yves MATILLON
- Département de formation et centre de recherche en Biologie Humaine Directeur : Mme Anne-Marie SCHOTT

SCIENCES ET TECHNOLOGIES

- Faculté des Sciences et Technologies Directeur : M. Fabien DE MARCHI
- UFR de Sciences et Techniques des Activités Physiques et Sportives (STAPS) Directeur : M. Yannick VANPOULLE
- Ecole polytechnique Universitaire de Lyon (ex ISTIL) Directeur : M. Pascal FOURNIER
- I.U.T. LYON 1 Directeur : M. Christophe VITON
- Institut des Sciences Financières et d'Assurance (ISFA) Directrice : M. Nicolas LEBOISNE
- ESPE Directeur : M. Alain MOUGNIOTTE

UNIVERSITE CLAUDE BERNARD LYON 1
ISPB – Faculté de Pharmacie Lyon
Directrice : Madame la Professeure Christine VINCIGUERRA
Directeurs Adjointes : Madame S. BRIANCON, Monsieur P. LAWTON, Monsieur P. NEBOIS
Madame S. SENTIS, Monsieur M. TOD

Directrice Administrative : Madame P. SILVEIRA

Liste des départements pédagogiques

Département pédagogique de sciences physico-chimique et pharmacie galénique

- **CHIMIE ANALYTIQUE, GÉNÉRALE, PHYSIQUE ET MINÉRALE**

- Monsieur Raphaël TERREUX (MCU-HDR)
- Monsieur Pierre TOULHOAT (Pr-PAST)
- Madame Julie-Anne CHEMELLE (MCU)
- Monsieur Lars-Petter JORDHEIM (MCU)
- Madame Christelle MACHON (AHU)

- **PHARMACIE GALÉNIQUE – COSMÉTOLOGIE**

- Madame Stéphanie BRIANCON (Pr)
- Madame Françoise FALSON (Pr)
- Monsieur Hatem FESSI (Pr)
- Madame Joëlle BARDON (MCU-HDR)
- Madame Marie-Alexandrine BOLZINGER (MCU-HDR)
- Madame Sandrine BOURGEOIS (MCU)
- Madame Ghania HAMDI-DEGOBERT (MCU)
- Monsieur Plamen KIRILOV (MCU)
- Monsieur Fabrice PIROT (MCU-PH-HDR)
- Monsieur Patrice SEBERT (MCU-HDR)

- **BIOPHYSIQUE**

- Monsieur Richard COHEN (PU-PH)
- Madame Laurence HEINRICH (MCU)
- Monsieur David KRYZA (MCU-PH)
- Madame Sophie LANCELOT (MCU-PH)
- Monsieur Cyril PAILLER-MATTEI (MCU)

Département pédagogique pharmaceutique de santé publique

- **DROIT DE LA SANTÉ**

- Monsieur François LOCHER (PU-PH)
- Madame Valérie SIRANYAN (MCU-HDR)

- **ECONOMIE DE LA SANTÉ**

- Madame Nora FERDJAQUI MOUMJID (MCU-HDR)
- Monsieur Hans-Martin SPÄTH (MCU)
- Madame Carole SIANI (MCU-HDR)

- **INFORMATION ET DOCUMENTATION**

- Monsieur Pascal BADOR (MCU-HDR)

- **HYGIÈNE, NUTRITION, HYDROLOGIE ET ENVIRONNEMENT**

- Madame Joëlle GOUDABLE (PU-PH)

- **INGENIEURIE APPLIQUEE A LA SANTE ET DISPOSITIFS MEDICAUX**
Monsieur Gilles AULAGNER (PU-PH)
Monsieur Daniel HARTMANN (Pr)
- **QUALITOLOGIE – MANAGEMENT DE LA QUALITE**
Madame Alexandra CLAYER-MONTEMBAULT (MCU)
Monsieur François COMET (MCU)
Monsieur Vincent GROS (MCU PAST)
Madame Pascale PREYNAT (MCU PAST)
- **MATHEMATIQUES – STATISTIQUES**
Madame Claire BARDEL-DANJEAN (MCU)
Madame Marie-Aimée DRONNE (MCU)
Madame Marie-Paule PAULTRE (MCU-HDR)

DEPARTEMENT PEDAGOGIQUE SCIENCES DU MEDICAMENT

- **CHIMIE ORGANIQUE**
Monsieur Pascal NEBOIS (Pr)
Madame Nadia WALCHSHOFER (Pr)
Monsieur Zouhair BOUAZIZ (MCU-HDR)
Madame Christelle MARMINON (MCU)
Madame Sylvie RADIX (MCU-HDR)
Monsieur Luc ROCHEBLAVE (MCU-HDR)
- **CHIMIE THERAPEUTIQUE**
Monsieur Roland BARRET (Pr)
Monsieur Marc LEBORGNE (Pr)
Monsieur Laurent ETTOUATI (MCU-HDR)
Monsieur Thierry LOMBERGET (MCU-HDR)
Madame Marie-Emmanuelle MILLION (MCU)
- **BOTANIQUE ET PHARMACOGNOSIE**
Madame Marie-Geneviève DIJOUX-FRANCA (Pr)
Madame Isabelle KERZAON (MCU)
Monsieur Serge MICHALET (MCU)
- **PHARMACIE CLINIQUE, PHARMACOCINETIQUE ET EVALUATION DU MEDICAMENT**
Madame Roselyne BOULIEU (PU-PH)
Madame Magali BOLON-LARGER (MCU-PH)
Madame Céline PRUNET-SPANO (MCU)
Madame Catherine RIOUFOL (MCU-PH)

DEPARTEMENT PEDAGOGIQUE DE PHARMACOLOGIE, PHYSIOLOGIE ET TOXICOLOGIE

- **TOXICOLOGIE**
Monsieur Jérôme GUITTON (PU-PH)
Monsieur Bruno FOUILLET (MCU)
Madame Sylvain GOUTELLE (AHU)
Madame Léa PAYEN (MCU – HDR)
- **PHYSIOLOGIE**
Monsieur Christian BARRES (Pr)
Monsieur Daniel BENZONI (Pr)
Madame Kiao Ling LIU (MCU)
Monsieur Ming LO (MCU-HDR)

- **PHARMACOLOGIE**

Monsieur Bernard RENAUD (Pr)
Monsieur Michel TOD (PU-PH)
Monsieur Luc ZIMMER (PU-PH)
Madame Bernadette ASTIER (MCU- HDR)
Monsieur Roger BESANCON (MCU)
Madame Evelyne CHANUT (MCU)
Monsieur Nicolas KUCZEWSKI (MCU)

Monsieur Olivier CATALA (Pr PAST)
Monsieur Pascal THOLLOT (MCU PAST)
Madame Corinne FEUTRIER (MCU PAST)

DEPARTEMENT PEDAGOGIQUE DES SCIENCES BIOMEDICALES A

- **IMMUNOLOGIE**

Monsieur Jacques BIENVENU (PU-PH)
Monsieur Guillaume MONNERET (PU-PH)
Madame Cécile BALTER-VEYSSEYRE (MCU-HDR)
Monsieur Sébastien VIEL (AHU)

- **HEMATOLOGIE ET CYTOLOGIE**

Madame Christine TROUILLOT-VINCIGUERRA (PU-PH)
Madame Brigitte DURAND (MCU-PH)
Monsieur Olivier ROUALDES (AHU)

- **MICROBIOLOGIE ET MYCOLOGIE FONDAMENTALE ET APPLIQUEE AUX BIOTECHNOLOGIES INDUSTRIELLES**

Monsieur Patrick BOIRON (Pr)
Monsieur Jean FRENEY (PU-PH)
Madame Florence MORFIN (PU-PH)
Monsieur Didier BLAHA (MCU)
Madame Anne DOLEANS JORDHEIM (MCU)
Madame Emilie FROBERT (MCU-PH)
Madame Véronica RODRIGUEZ-NAVA (MCU)
Madame Ghislaine DESCOURS (AHU)

- **PARASITOLOGIE, MYCOLOGIE FONDAMENTALE**

Monsieur Philippe LAWTON (Pr-HDR)
Madame Nathalie ALLIOLI (MCU)
Madame Samira AZZOUZ-MAACHE (MCU-HDR)

DEPARTEMENT PEDAGOGIQUE DES SCIENCES BIOMEDICALES B

- **BIOCHIMIE – BIOLOGIE MOLECULAIRE – BIOTECHNOLOGIE**

Madame Pascale COHEN (Pr)
Monsieur Alain PUISIEUX (PU-PH)
Monsieur Karim CHIKH (MCU-PH)
Madame Carole FERRARO-PEYRET (MCU-PH)
Madame Caroline MOYRET-LALLE (MCU-HDR)
Madame Angélique MULARONI (MCU)
Madame Stéphanie SENTIS (MCU)
Monsieur Olivier MEURETTE (MCU)
Monsieur Benoit DUMONT (AHU)

- **BIOLOGIE CELLULAIRE**
Madame Bénédicte COUPAT-GOUTALAND (MCU)
Monsieur Michel PELANDAKIS (MCU-HDR)
- **INSTITUT DE PHARMACIE INDUSTRIELLE DE LYON**
Monsieur Philippe LAWTON (Pr-HDR)
Madame Angélique MULARONI (MCU)
Monsieur Patrice SEBERT (MCU-HDR)
Madame Valérie VOIRON (MCU-PAST)
- **Assistants hospitalo-universitaires sur plusieurs départements pédagogiques**
Madame Emilie BLOND
Madame Christelle MOUCHOUX
Madame Florence RANCHON
- **Attachés Temporaires d'Enseignement et de Recherche (ATER)**
Monsieur Eyad AL MOUAZEN 85ème section
Monsieur Boyan GRIGOROV 87ème section
Madame Mylène HONORAT 85ème section
Monsieur Abdalah LAOUINI 85ème section
Madame Marine CROZE 86ème section

Pr : Professeur

PU-PH : Professeur des Universités, Praticien Hospitalier

MCU : Maitre de Conférences des Universités

MCU-PH : Maitre de Conférences des Universités, Praticien Hospitalier

HDR : Habilitation à Diriger des Recherches

AHU : Assistant Hospitalier Universitaire

PAST : Personnel Associé Temps Partiel

REMERCIEMENTS

A Monsieur le Professeur Jean Freney,

Vous me faites le très grand honneur de présider ce jury de thèse. Vous étiez mon Professeur de microbiologie au cours de mes années d'études à la faculté de Pharmacie. Je vous remercie pour vos enseignements dispensés et pour la confiance que vous m'accordez en acceptant de juger ce travail. Je vous remercie pour votre disponibilité et votre implication dans cette dernière étape qu'est la rédaction du mémoire de thèse.

A Madame le Docteur Oana Dumitrescu,

Je te remercie de m'avoir encadrée tout au long de ce travail et de m'avoir aidée à donner forme à mes résultats, que ce soit en poster, présentation et aujourd'hui mémoire de thèse. Je te remercie pour ta présence à la fois au cours de nos travaux mais également au quotidien au sein du laboratoire. Je te remercie pour la justesse de tes jugements qui ont su me faire avancer, me remettre en question et prendre de l'assurance.

A Monsieur le Professeur Gérard Lina,

Je vous remercie de m'avoir accueillie en tant qu'interne au sein de votre laboratoire et de m'avoir confiée ce travail. Je vous remercie pour votre bienveillance et votre implication dans mes projets qu'ils soient de thèse ou de carrière. Je vous remercie pour la confiance que vous m'avez accordée dès mon arrivée en niveau 2 au sein du laboratoire de bactériologie de Lyon Sud. Je suis fière d'avoir été votre interne et aujourd'hui honorée de votre présence dans ce jury de thèse.

A Monsieur le Docteur Jean-Paul Steghens,

Je vous remercie pour votre aide dans la mise au point de cette étude, pour votre encadrement dans ce projet et pour la confiance que vous m'avez accordée en me laissant travailler seule sur l'HPLC. Cette collaboration bactériologie-biochimie fut un succès. J'espère qu'elle continuera.

A Monsieur le Professeur François Vandenesch,

Vous me faites l'honneur de participer à mon jury de thèse. Je vous en remercie sincèrement. Je vous suis très reconnaissante de m'avoir offert l'opportunité de travailler au sein de votre laboratoire et c'est avec fierté que je rejoindrai votre équipe dès le mois de mai.

A ceux qui ont participé à ce projet,

A Madame le Docteur Emilie Martin, merci pour ton encadrement dans ce projet, pour ta présence à tout moment, pour tes réponses à toutes ces questions que l'on n'ose poser à personne et qui sont pourtant indispensables au commencement d'une thèse. Je te souhaite une bonne continuation sur Paris. Je suis fière d'avoir pu travailler à tes côtés.

A Madame le Docteur Emilie Blond, merci pour tes conseils, merci pour ton bureau toujours ouvert et merci pour ta présence qui fait que même quand je quitte le laboratoire à 22 heures, je ne suis pas la dernière.

A Anaëlle Muggeo, pour ton aide et pour ce beau projet de M1 que nous avons réalisé ensemble. Je te souhaite une bonne continuation. A Jennifer Deleo, pour ton implication et ton point de vue de chimiste. Tu as réalisé un beau travail. A Séverine Perian, nous te passons la relève. Je te souhaite beaucoup de réussite.

A mes aînés biologistes,

A Monsieur le Docteur Sylvestre Tigaud, je vous remercie de m'avoir accueillie comme interne de niveau 1 au sein de votre laboratoire et de m'avoir donnée envie de continuer dans le domaine de la bactériologie. Je vous remercie pour vos enseignements et pour m'avoir fait partager votre savoir.

Aux biologistes du laboratoire de bactériologie de Lyon Sud, je vous remercie pour votre encadrement et vos enseignements. A Monsieur le Professeur Jean-Pierre Flandrois et Monsieur le Professeur Gérard Carret pour m'avoir fait comprendre la justesse du "biodiv". A Madame le Docteur Isabelle Fredenucci pour ses conseils et sa détermination à faire avancer les choses. A Madame le Docteur Michèle de Montclos et au nouvellement arrivé Monsieur le Docteur Jean-Philippe Rasigade.

Aux biologistes de Vienne, à Madame le Docteur Anne-Laure Danquigny, à Madame le Docteur Céline Darnaud, à Madame le Docteur Viviane Blanc-Pattin et bien sûr à Monsieur le Docteur Bernard Rivoire, je vous remercie pour ces 6 mois d'interne passés chez vous, pour la formation que vous m'avez dispensée et pour la confiance que vous m'avez accordée. Merci pour le chocolat!

A mes parents,

Je vous dédie cette thèse à vous qui m'avez toujours fait confiance, qui m'avez tout offert. Je vous remercie pour mon enfance pourrie-gatée mais également pour m'avoir appris à estimer la chance que j'avais. Je vous remercie d'avoir toujours été là à mes côtés. Je suis qui je suis grâce à vous et chacune de mes victoires est la vôtre.

A mon frère, et à Elo ❤️

Pour tout ce que nous avons partagé depuis des années, de nos vacances enfants à nos discussions d'adultes sur l'immobilier. Je suis fière de notre complicité et de pouvoir être là pour toi même si souvent c'est l'inverse. Merci de ne pas désespérer et de répondre présent à chaque fois que j'accroche ma voiture, que je veux changer une ampoule et que je plante mon ordi. Qu'est-ce que je ferai sans toi?

A Cyril,

Mon amour, je te remercie pour ta présence à mes côtés, pour tous les bons moments que nous partageons, nos discussions, nos fous rires, nos projets. Je suis heureuse avec toi. Je te remercie également d'avoir relu ce mémoire de thèse. Et comme je tiens toujours mes promesses : merci pour le ménage le 8 décembre ! Je t'embrasse fort.

A mes oncles et tantes, mes cousins, cousines, mes grands-parents,

***A toute ma grande et belle famille,** je suis fière que nous soyons toujours aussi proches. Merci pour les grands repas de Noël, les vacances en camping, les pique-niques du 15 août organisés début juillet, les ballons prisonniers, les soirées à la colo, ... mes souvenirs sont remplis de moments partagés avec vous. Une pensée toute particulière à **Lorène** pour notre séjour à Avignon et Marseille. Je sais que tu aurais aimé être là ce soir mais tu comprendras que trouver un moment où tu es en France est assez difficile.*

***A mes grands-parents,** Pépé et Mémé que j'embrasse fort et Mamie à qui je pense souvent. Je vous aime.*

***Aux copines de maman,** un grand merci à mes correctrices. Je vous suis très reconnaissante pour ce travail de relecture que vous avez effectué.*

A Dadou et Lili,

A mon amie d'enfance avec qui j'ai grandi et à ta maman qui fut la meilleure nounou imaginable. Merci pour ces années de bonheur, tu es une grande sœur pour moi. A David, mon meilleur ami du lycée, je te remercie pour ces années d'insouciance à refaire le monde. Je vous souhaite beaucoup de bonheur avec votre petit Gabriel.

A Sophie, Stéphanie et Emilie,

Même si nous ne nous voyons que rarement, c'est toujours avec un grand bonheur que je rentre à St Etienne pour vous voir. Je vous remercie pour votre amitié.

A mes amis de fac,

Je vous remercie pour ces années de fêtes et de travail bien sûr !

*A Anaïs, je te remercie d'avoir créé ce lien qui nous unit, d'avoir pris l'initiative de discuter avec moi dans ce grand amphi de P1 et aujourd'hui encore d'être celle qui nous réunit tous. Une bise à **Marc**.*

A Leslie, "ma coloc" qui gardera à jamais ce titre ! Merci pour ces années de vie partagées, pour les sorties théâtre, pour la musique, pour le jumelage de notre coloc avec celle de Paris, pour les cactus qui sont morts et pour la récolte de sapins.

A Laure, je te remercie pour ta bonne humeur. Continues à nous appeler chaque fois que tu es à Lyon, c'est un grand plaisir de te voir.

A Guillaume et Charlotte, je vous remercie pour l'hébergement à Tours cet été. C'était de superbes vacances.

A Camille et Raphaël, toutes mes félicitations. Votre bonheur nous réjouit.

A Xavier, toujours aussi surprenant !

A Vinciane, pour les séances de sport au club Jean Jaurès.

A Nicnic et Matmat, pour nos vacances en Croatie et une dédicace à Mario du poste de police de Dubrovnik.

A mes amis internes,

Merci pour ces 4 années (et plus) passées ensemble. Vous êtes des rencontres inoubliables qui je l'espère sont le début de longues amitiés.

*A **Charlotte**, dont je ne peux plus me séparer depuis notre semestre d'hémato à "Sainté". Ce fut un réel plaisir de travailler avec toi et t'avoir en amie est encore plus merveilleux.*

*A **Cécile**, pour la sortie raquette sans pneus neige. J'ai hâte que nous soyons à la Réunion pour se revoir.*

*A **Foufou**, nos années de fac en commun ne nous avaient pas permis de nous connaître. Je suis contente que l'internat nous ait offert une seconde chance.*

*A **Aristide**, le grand danseur de Salsa ! Merci pour ton amitié.*

*A **Anne**, la parisienne. Je suis heureuse que ton internat t'ait amenée parmi nous. A **Oriane**, je compte sur toi pour venir prendre le café avec nous en bactério ! A **Anne-Gaëlle**, un grand merci pour ta bonne humeur, c'est un plaisir de travailler avec toi au quotidien.*

*A **Lorna**, j'adore m'arrêter discuter à la porte de ton bureau. Merci pour ton écoute.*

*A **Cécile B, Vecheak**, et à tous ceux que j'ai croisés au cours de mes stages : A **Marina, Mélanie** et **Mickaël** de "Sainté". Ce fut un super semestre. Aux filles d'hémato, **Elsa, Alice et Fanélie**, ça n'a pas été un semestre facile mais on s'en est bien sortie et j'en garde un bon souvenir. A **Elisabeth**, un modèle de persévérance dans la recherche. Je t'admire. A mes nouvelles co-internes : **Marion, Marie** et **Christina**, je conclue mon internat à vos côtés. C'est une belle fin et je suis contente d'avoir pu vous connaître.*

A mes amis techniciens,

*Au pool de nuit d'HEH (enfin ceux de mon époque, les dinosaures !). A **Vincent**, bienvenue dans le monde du jour ! A **Antho**, félicitations au papa.*

*Aux **technicien(ne)s de bactério de Lyon Sud**, merci pour tout ce que vous m'avez appris. Vous êtes une équipe efficace et travailleuse. Soyez fière de ce que vous faites. Moi je suis fière de vous.*

*Aux **techniciennes de bactério de la Croix-Rousse**, merci d'avoir pris le temps de me former à mes débuts. Merci pour votre patience.*

Sommaire

LISTE DES FIGURES.....	16
LISTE DES TABLEAUX	16
TABLE DES ABREVIATIONS	17
Introduction.....	18
Partie Bibliographique.....	19
I. <i>Staphylococcus aureus</i>	19
II. Pathologies à <i>S. aureus</i>	20
II.1. Généralités	20
II.2. Infections invasives	20
II.3. Infections toxiques	21
II.3.1. Le choc toxique staphylococcique.....	21
II.3.2. L'intoxication alimentaire.....	23
II.3.3. Autres pathologies liées aux superantigènes.....	23
II.3.4. Les syndromes d'exfoliation	23
II.4. Infections mixtes	24
II.4.1. La bactériémie	24
II.4.2 Les endocardites.....	25
II.4.3. Les infections ostéo-articulaires.....	25
II.4.4. La pneumonie nécrosante.....	25
III. Physiopathologie de l'infection à <i>Staphylococcus aureus</i>	26
III.1. La phase d'invasion	26
III.1.1. <i>Staphylococcus aureus</i> et le système immunitaire	26
- Le système immunitaire.....	26
- Modulation du système immunitaire par <i>S. aureus</i>	27
- Résistance à la phagocytose	27

- Survie dans les phagosomes	29
- Surexpression du système immunitaire.....	30
III.1.2. Les facteurs de colonisation	30
III.2. Les toxines	31
III.2.1 Les toxines formant des pores ou "Pore Forming Toxins" (PFTs):.....	32
- L' α -toxine	33
- La β -hémolysine	34
- La δ -toxine et les PSMs.....	34
- La PVL et la γ -toxine	35
III.2.2. Les superantigènes.....	36
III.2.3. Les épidermolysines	39
III.3. Physiologie : les systèmes régulateurs	39
III.3.1. Le quorum-sensing : <i>agr</i>	39
III.3.2. les autres régulateurs.....	41
- SaeRS	41
- ArIRS	42
- SrrAB.....	42
- Le facteur Sigma(B)	42
- SarA et ses homologues	42
III.3.3. Régulation globale des toxines.....	44
IV. Les Phenol-Solubles Modulines (PSMs), particularités	45
IV.1. Structures.....	45
IV.1.1. Les PSMs : structure primaire et génétique.....	45
IV.1.2. Les PSMs : structure tertiaire et système d'export.....	46
IV.1.3. PSM-mec	47
IV.1.4. Les dérivés de PSMs	47

IV.1.5. L'auréolysine	47
IV.2. PSMs et virulence	48
IV.2.1. PSMs et niveau d'expression	48
IV.2.2. Activités pro-inflammatoire et cytolytique.....	48
IV.2.3. Activité intracellulaire	50
IV.2.4. Adhésion et dissémination.....	50
IV.2.5. Activité de PSM-mec	51
IV.2.6. Activité des dérivés des PSMs.....	51
IV.3. Mécanisme d'action	51
IV.3.1. Action FPR2 dépendante.....	51
IV.3.2. Les récepteurs FPR2	52
IV.3.3. Action FPR2 indépendante.....	52
IV.4. Régulation	53
V. <i>Staphylococcus aureus</i> résistant à la méticilline (SARM).....	54
V.1. Emergence et définition de la résistance.....	54
V.2. Support génétique de la résistance à la méticilline	54
V.3. Epidémiologie.....	56
V.3.1. Les SARM en France	56
V.3.2. SARM communautaire (CA-MRSA)	57
VI. Antibiotiques anti- <i>Staphylococcus</i>	57
VI.1. β -lactamines.....	57
VI.2. Glycopeptides.....	58
VI.3. Linézolide	58
VI.4. Rifampicine.....	58
VI.5. Fluoroquinolones	59
VI.6. Clindamycine	59

VI.7. Tigécycline	59
VII. Impact des antibiotiques sur l'expression des toxines	60
VII.1. Impact sur la PVL.....	60
VII.2. Impact sur les autres toxines	61
VII.3. Impact sur les PSM-alpha.....	61
Problématique.....	63
Partie Expérimentale.....	64
I. Matériels et méthodes.....	64
I.1. Souches bactériennes.....	64
I.2. Antibiotiques et détermination des Concentrations Minimales Inhibitrices (CMI)...	65
I.3. Culture bactérienne.....	65
I.4. Quantification de l'ARNm PSM α 1/2 et PSM α 3	66
I.5. Dosage des PSM α	68
II. Résultats	70
II.1. CMI	70
II.2. Efficacités des amorces	71
II.3. Mise au point de la méthode de dosage des PSM α	71
II.4. Effet des antibiotiques sur la croissance bactérienne	74
II.5. Effet des antibiotiques sur l'expression des gènes <i>psm</i> α 1/2 et <i>psm</i> α 3.....	76
II.6. Effet des antibiotiques sur la production des PSM α	80
Discussion	84
Annexe :.....	90
Conclusions.....	97
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES.....	99

LISTE DES FIGURES

Figure 1 : Mécanismes permettant à <i>Staphylococcus aureus</i> d'éviter l'opsonisation [Foster T. 2005 (4)]	29
Figure 2 : Exemple d'assemblage des toxines formant des pores de type bêta [Miles G, et al. 2006 (20)]	33
Figure 3 : Mécanisme d'action des superantigènes [Foster T. 1996 (1)].....	38
Figure 4 : Régulation des facteurs de virulence chez <i>Staphylococcus aureus</i> [Yarwood JM, et al. 2003 (28)]	41
Figure 5 : PSMs chez <i>Staphylococcus aureus</i> : gènes et structures [Schwartz K et al. 2012(42)].....	46
Figure 6 : Equation mathématique utilisée par le modèle REST® (Relative Expression Software Tool)	67
Figure 7 : Schéma du montage de l'HPLC pour la quantification des PSM α	68
Figure 8 : Chromatogramme type obtenu par HPLC-MS sur un surnageant après 24 heures de culture de la souche SF8300 (clone USA300)	72
Figure 9 : Quantification des PSM α dans les milieux de culture en fonction des souches	73
Figure 10 : Croissance bactérienne en fonction du temps – exemple de résultats attendus	74
Figure 11 : Croissance bactérienne en fonction du temps – cas de l'oxacilline.....	75
Figure 12 : Croissance bactérienne en fonction du temps – cas de la tigécycline	75
Figure 13 : Souche Géraldine HT20030749 - Quantification relative des variations d'ARNm PSM α	76
Figure 14 : Souche Géraldine HT20050614 - Quantification relative des variations d'ARNm PSM α	77
Figure 15 : Souche Lyon HT20040012 - Quantification relative des variations d'ARNm PSM α	78
Figure 16 : Souche Lyon HT20061175 - Quantification relative des variations d'ARNm PSM α	79
Figure 17 : Quantification relative de PSM α 1/2 après 6 heures de culture	81
Figure 18 : Quantification relative de PSM α 3 après 6 heures de culture	81
Figure 19 : Quantification relative de PSM α 1/2 après 24 heures de culture	82
Figure 20 : Quantification relative de PSM α 3 après 24 heures de culture	83

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1 : Description des souches utilisées pour l'étude	64
Tableau 2 : Séquences et références des amorces utilisées au cours de l'étude	67
Tableau 3 : CMI ($\mu\text{g}/\text{mL}$) et concentrations critiques selon l'EUCAST 2014 (110)	70
Tableau 4 : Efficacités des amorces calculées par le logiciel REST2009®	71
Tableau 5 : Caractéristiques des PSM α en HPLC-MS, structure et masses détectables.....	71

TABLE DES ABREVIATIONS

ADAM10 : A Desintegrin And Mettaloproteinase 10
ADN : Acide Désoxyribonucléique
Agr : Accessory gene regulator
AIP : Auto-Inductible Peptide
ARNm : Acide Ribonucléique messenger
CA-SFM : Comité de l'Antibiogramme – Société Française de Microbiologie
CC : Complexe Clonal
CHIPS : Chemotaxis Inhibiting Protein of *S. aureus*
CMH : Complexe Majeur d'Histocompatibilité
CMI : Concentration Minimale Inhibitrice
Ct : Cycle theresold
DO : densité optique
ETA / ETB : Exfoliatine Toxin A / B
EUCAST : European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing
FAME : Fatty Acid Modifying Enzyme
FPR : Formyl Peptide Receptor
HPLC : Haute Performance Liquide Chromatographique
IFN : Interferon
IL : Interleukine
MLST : Multilocus Sequence Typing
MSCRAMMs : Microbial Surface Components Recognizing Matrix Molecules
NTED : Neonatal TSS-like Exanthematous Disease
PCR / qRT-PCR
PLP : Protéine liant la Pénicilline
PSM : Phenol-Soluble Moduline
PVL : Panton-Valentine Leucocidine
REDD : Recalcitrant Erythematous Desquamating Disorder
SARM : *Staphylococcus aureus* résistant à la méticilline
SCC : Staphylococcal cassette chromosome
SCIN : *Staphylococcus* Complement Inhibitor
SE / SE-I : Staphylococcal Enterotoxin / Staphylococcal Enterotoxin – like
SIDA : Syndrome d'immunodéficience acquise
SLUSH : *Staphylococcus lugdunensis* synergistic hemolysin
SSSS : Staphylococcal Scalded Skin Syndrom
TCR : T-cell Receptor
TNF : Tumor Necrosis Factor
TSS : Trypticase Soja Sang
TSST : Toxic shock syndrome toxin
UFC : Unité Formant Colonie
VIH : Virus de l'immunodéficience humaine

Introduction

A la fois commensal et pathogène, *Staphylococcus aureus* est responsable d'un nombre important et varié d'infections. La virulence de ce germe repose sur son aptitude à neutraliser le système immunitaire, notamment par l'intermédiaire de toxines sécrétées. Parmi les toxines, les "Phénol-Solubles Modulines" sont des peptides sécrétés par l'ensemble des *S. aureus* récemment découverts. En fonction de leur niveau d'expression, elles ont une activité pro-inflammatoire et/ou cytolytique. La présence de PSMs à un niveau élevé chez les *S. aureus* résistant à la méticilline (SARM) d'origine communautaire pourrait être une explication à la forte virulence de ces souches.

Certains antibiotiques utilisés au cours des infections à staphylocoques ont montré leur capacité à moduler l'expression de facteurs de virulence, tel que la leucocidine de Panton-Valentine et la toxine du choc toxique. Les antibiotiques diminuant l'expression de ces toxines sont dits anti-toxiniques et leur utilisation au cours d'infections sévères à *S. aureus* apporte un bénéfice au pronostic du patient. A l'inverse, d'autres antibiotiques augmentent l'expression des toxines.

Dans ce mémoire, nous allons dans un premier temps faire le point sur les pathologies et les facteurs de virulence de *S. aureus*, en particulier les PSMs. Nous reverrons les antibiotiques utilisables en thérapeutique et leur impact sur l'expression des toxines.

Dans un second temps, nous présenterons nos résultats obtenus au cours de l'étude de l'influence des antibiotiques à concentrations sub-inhibitrices sur l'expression des PSM α chez *S. aureus*. Nous analyserons l'impact de nos conclusions sur la prise en charge thérapeutique du patient et développerons des pistes de travail pouvant nous permettre de mieux comprendre la physiopathologie des infections à *S. aureus*.

Partie Bibliographique

I. *Staphylococcus aureus*

Staphylococcus aureus est une bactérie d'1 µm de diamètre, cocci à Gram positif, appartenant à la famille des *Firmicutes*. Sa culture est facile, pouvant se réaliser en aérobie et en anaérobie. Il est responsable d'hémolyse lors de culture sur gélose au sang où il exprime également un pigment jaune or caractéristique. Son génome est constitué d'un chromosome circulaire d'environ 2800 paires de bases, avec des prophages, des plasmides et des transposons. La membrane cytoplasmique des staphylocoques est composée à 50 % de peptidoglycane, polysaccharide associant des sous-unités de N-acétylglucosamine et d'acide N-acétylmuramique, auquel se lient des acides teichoïques, polymère de glycérol phosphate (1). La plupart des staphylocoques possèdent une capsule et dans les infections humaines, ce sont les capsules de type 5 et 8 qui sont le plus fréquemment impliquées (75 % des cas) (2).

L'homme est un réservoir naturel de *S. aureus*. En effet, 20 % de la population présente un portage permanent de cette bactérie et dans ce cas, une seule souche est retrouvée et elle persiste au cours du temps. Jusqu'à 60 % de la population peut présenter un portage intermittent, et la souche en cause peut alors varier à chaque épisode de portage (3, 4). Les staphylocoques sont des commensaux de la peau et des muqueuses. Adaptés à l'écosystème cutané, ils jouent un rôle important dans l'équilibre physico-chimique de la peau et participent activement à la barrière cutanée protectrice. L'habitat préférentiel de *S. aureus* est la muqueuse nasale, notamment au niveau des fosses nasales antérieures, la gorge mais aussi les zones humides de la peau (aisselles, poignets, périnée) et le tractus gastro-intestinale (1, 5, 6). Les sites de colonisation sont des réservoirs responsables d'infections en cas de défenses immunitaires altérées (altération locale par blessure ou générale par immunodépression), d'insertion de matériel ou de chirurgie. La colonisation augmente significativement le risque d'infection et les patients s'infectent le plus souvent avec leur propre souche. La colonisation favorise également la transmission manuportée, notamment dans les situations de soins (6).

A la fois commensal et pathogène, *S. aureus* est un germe bivalent. C'est l'une des espèces les plus couramment isolée en milieu hospitalier où il est le second germe responsable d'infections après *Escherichia coli*. Son isolement au cours d'infections communautaires est également de plus en plus fréquent. Le caractère ubiquitaire, la résistance aux antibiotiques, l'expression de facteurs de virulence par la bactérie et la diminution des défenses immunitaires des patients hospitalisés, sont autant de facteurs expliquant la fréquence et la gravité des infections à *S. aureus* (5).

II. Pathologies à *S. aureus*

II.1. Généralités

S. aureus est un germe pyogène responsable d'une grande variété d'infections : des infections superficielles de la peau ou des abcès mais également des infections profondes comme les ostéomyélites ou les endocardites. Classiquement décrit comme un pathogène extracellulaire responsable d'infections aiguës, il peut néanmoins survivre dans des compartiments intracellulaires, entraînant ainsi des infections chroniques (1). Les infections dont il est responsable sont réparties en deux groupes : les infections dites invasives, liées à la capacité de la bactérie à envahir un site et à se développer ; les infections dites toxiques liées à la sécrétion de toxines par la bactérie causant une symptomatologie caractéristique. En pratique, la majorité des infections nécessite les deux versants de la bactérie, sa capacité à envahir et ses toxines, facteurs de virulence.

II.2. Infections invasives

Les infections suppuratives de la peau et des muqueuses à *S. aureus* se font le plus souvent à partir de la souche portée par le patient et peuvent compliquer une intervention chirurgicale, une pose de matériel, ou se développer en parallèle d'une baisse d'immunité. Elles peuvent être bénignes ou sévères, locales ou étendues avec des signes généraux. La folliculite est une infection limitée au niveau du follicule pileux se présentant sous forme d'une pustule jaunâtre, entourée d'une zone inflammatoire rouge. Le furoncle est une

infection nécrotique du follicule pileux, plus profonde, douloureuse, il s'accompagne parfois de fièvre. L'anthrax est une lésion nécrotique de la peau associée à des signes généraux (5).

Les infections sur matériels, notamment cathéters, voies centrales et sondes urinaires impliquent le plus souvent des germes cutanés, dont *S. aureus*.

Les infections locales peuvent se compliquer en infections plus profondes, par extension locorégionale ou par dispersion de la bactérie par voie hématogène. Ainsi *S. aureus* peut être responsable de septicémie, d'endocardites, d'infections ostéo-articulaires, de pneumopathies, de thrombophlébites septiques sur cathéters, de sinusites chroniques et plus rarement d'infections urinaires ou d'infections du système nerveux central (1, 5).

II.3. Infections toxiques

Les maladies associées à la production d'une toxine par *S. aureus* sont de 2 types : tout d'abord le choc toxique et l'intoxication alimentaire qui bien que très différents sont tous les deux liés à la production de toxines dites superantigènes ; puis les syndromes d'exfoliation généralisée, nommés SSSS pour "Staphylococcal Scalded Skin Syndrom", qui sont à relier à la production d'exfoliatines. Ces pathologies sont dues à la diffusion de toxines à partir d'un foyer infectieux ou à l'ingestion d'une toxine préformée dans un aliment (5).

II.3.1. Le choc toxique staphylococcique

Le choc toxique staphylococcique est une pathologie aiguë et potentiellement mortelle (létalité d'environ 10 %) (5), associant une fièvre élevée, une érythrodermie généralisée suivie d'une desquamation, une hypotension et au moins trois atteintes viscérales (atteinte digestive avec vomissement ou diarrhées, atteinte musculaire avec myalgies, atteinte des muqueuses avec hyperhémie conjonctivale ou vaginale, atteinte rénale avec insuffisance rénale ou pyurie sans germes, atteinte hématologique avec thrombopénie, atteinte du système nerveux central avec troubles de la conscience). L'ensemble des critères sont rarement présents, ce qui amène à classer la plupart des diagnostics de chocs toxiques en diagnostics probables. L'ajout des critères de Parsonnet, à savoir : présence de *S. aureus* dans une muqueuse, caractère toxinique de la souche isolée et état sérologique du patient, permet de reclasser certains de ces cas (7).

Le choc toxique staphylococcique menstruel a été décrit dans les années 80 chez des femmes utilisant des tampons super-absorbants en période menstruelle. La pathologie est initiée par une colonisation vaginale à *S. aureus* et non une infection. Les tampons super-absorbants faciliteraient cette colonisation en favorisant le développement de la bactérie par apport d'oxygène au détriment du développement de la flore vaginale normale, anaérobie préférentielle. De plus TSST-1, la toxine du choc toxique, responsable de 90 % de ces infections, est préférentiellement produite en aérobiose. Elle diffuse alors dans le sang au travers de la muqueuse vaginale et induit le choc toxique par un mécanisme de superantigène. L'implication majeure de TSST-1 dans cette pathologie s'explique par le fait que cette toxine est produite en quantité supérieure aux autres superantigènes et par sa capacité à franchir les muqueuses (8, 9).

Les chocs toxiques staphylococciques non menstruels représentent environ un tiers des cas de chocs toxiques staphylococciques et leur mortalité est plus élevée. Ils se développent suite à une infection localisée à *S. aureus* ou une chirurgie. Des cas de chocs toxiques staphylococciques non menstruels récurrents sont décrits. La toxine TSST-1 est impliquée dans 50 % de ces chocs. Les entérotoxines SEB et SEC sont responsables des autres cas. Ces trois superantigènes sont produits à des concentrations plus élevées que les autres superantigènes, expliquant leur forte prévalence. Comme au cours des chocs toxiques staphylococciques menstruels, c'est la diffusion hématogène de la toxine qui déclenche la symptomatologie (8, 9).

La scarlatine staphylococcique est une forme mineure du choc toxique, impliquant la toxine TSST-1 ou les entérotoxines SEA et SEB. Chez les nouveau-nés, cette pathologie prend le nom de NTED pour "Neonatal TSS-like Exanthematous Disease" et associe un érythème scarlatiniforme typique régressant en 48 heures suivi d'une fine desquamation, une fièvre et une thrombopénie, sans choc ni défaillance multi-viscérale. Elle régresse spontanément sans traitement (10).

Chez les patients atteints de VIH au stade SIDA, une autre forme incomplète est décrite, nommée REDD pour "Recalcitrant Erythematous Desquamating Disorder". Elle se présente sous forme d'une fièvre et de lésions scarlatiniformes, compliquées de défaillances multi-viscérales mais sans état de choc. La mortalité est élevée (8).

II.3.2. L'intoxication alimentaire

Les intoxications alimentaires à *S. aureus* représentent 15 à 30 % des toxi-infections alimentaires collectives, soit la deuxième étiologie après *Salmonella*. Elles sont provoquées par l'ingestion d'entérotoxines staphylococciques qui entraînent la stimulation des récepteurs neuronaux du système gastro-intestinal par l'intermédiaire de la synthèse d'acide arachidonique par les mastocytes. Les entérotoxines appartiennent à la famille des superantigènes mais présentent une activité émétique à la différence de TSST-1. Ces toxines sont thermostables, résistantes à la cuisson et aux enzymes digestives. La plus fréquemment impliquée est SEA (Staphylococcal Enterotoxin A). L'intoxication est caractérisée par une incubation courte de 1 à 6 heures, des crampes abdominales douloureuses, des vomissements, des diarrhées et l'absence de fièvre. L'évolution est le plus souvent favorable sans nécessiter de traitement (5, 8).

II.3.3. Autres pathologies liées aux superantigènes

La maladie de Kawasaki est une pathologie cardiaque de l'enfant, définie par une vascularite fébrile touchant les artères de petit et moyen calibre. La clinique est une fièvre associée à un érythème cutanéomuqueux, suivi d'une desquamation. L'évolution est favorable. L'étiologie de cette maladie n'est pas connue mais implique des superantigènes sécrétés par *S. aureus* (9).

Les superantigènes sont également impliqués dans les sepsis, les endocardites et les pneumonies (8). Ils ont alors un rôle de facteur de virulence au sein d'une pathologie impliquant à la fois le versant invasif et toxinique de *S. aureus*.

II.3.4. Les syndromes d'exfoliation

Le syndrome staphylococcique de la peau ébouillantée (SSSS pour Staphylococcal Scalded Skin Syndrome) et sa forme localisée l'impétigo bulleux sont liés à l'action de toxines épidermolytiques : les épidermolysines. La prévalence de ces syndromes est de 0,56 cas par an par million d'habitants et ils touchent principalement les enfants jeunes (11).

L'impétigo bulleux est une forme localisée avec présence de bulles cutanées au lieu même de production de la toxine, souvent aux extrémités. Les bulles peuvent contenir un liquide trouble qui renferme la souche de *S. aureus* productrice d'épidermolysines. La guérison se

fait en une semaine avec un traitement antibiotique adapté et entraîne l'ouverture des bulles suivie d'une cicatrisation (5).

Le syndrome staphylococcique de la peau ébouillantée représente la forme généralisée de cette pathologie avec diffusion par voie hématologique des épidermolysines à partir d'un foyer d'infection (plaie, abcès, infection ostéo-articulaire, pneumonie, ...) ou d'un foyer de colonisation (nez, nombril, ...) de *S. aureus*. Fréquemment retrouvé chez le nouveau-né ou le jeune enfant, il est nommé syndrome de Ritter von Ritterhain. Plus rarement, les adultes insuffisants rénaux, diabétiques ou immunodéprimés peuvent être touchés par cette pathologie. La maladie débute par de la fièvre et une érythrodermie douloureuse dominant sur le visage et les régions péri-orificielles (narines, plis). Les muqueuses sont épargnées. L'exfoliation apparaît quelques heures après, provoquant un décollement des zones érythémateuses qui intervient soit de manière spontanée, soit par frottement (signe de Nikolsky). Les bulles sont remplies d'un liquide clair, stérile, ne contenant que la toxine. La peau dénudée de sa couche épidermique présente un risque de surinfection. La guérison apparaît en une dizaine de jours sous traitement antibiotique adapté, sauf chez l'adulte immunodéprimé où la mortalité est élevée (environ 50 %) (5, 12, 13).

II.4. Infections mixtes

La majorité des infections à *S. aureus* implique à la fois le versant invasif (pénétration dans l'organisme et multiplication) et toxinique (sécrétion de facteurs de virulence) de la bactérie.

II.4.1. La bactériémie

La bactériémie à *S. aureus* peut se compliquer d'infections secondaires ou de choc septique. La présence de matériel, notamment cathéter, augmente le risque de bactériémie. La cellule endothéliale, élément central dans le processus d'infection, absorbe la bactérie par interaction de celle-ci avec les récepteurs membranaires. Cette position intracellulaire protège *S. aureus* des mécanismes de défense immunitaire de l'hôte et est la cause de la persistance et des récurrences des infections (2).

II.4.2 Les endocardites

S. aureus a la capacité d'adhérer à la surface des valves natives et prothétiques, qu'elles soient endommagées ou non, et de résister aux substances antimicrobiennes sécrétées par les plaquettes. L'invasion des cellules endothéliales par la bactérie initie des altérations cellulaires qui favorisent la formation de végétations. L'incidence des endocardites à *S. aureus* augmente, représentant 25 à 35 % de ces infections. Les patients à risque sont les utilisateurs de drogues intraveineuses avec le plus souvent des endocardites du cœur droit, les personnes âgées, les patients porteurs de valves prothétiques, et les patients hospitalisés (2).

II.4.3. Les infections ostéo-articulaires

Les infections ostéo-articulaires à *S. aureus* surviennent par voie hématogène ou par extension contiguë d'une infection. Elles se manifestent par une douleur, un gonflement local, une altération du mouvement et peuvent conduire à la destruction osseuse. La thérapeutique repose sur une antibiothérapie longue et de la chirurgie (2). Au cours de ces infections, les facteurs de virulence de *S. aureus* inhibent la prolifération d'ostéoblastes, induisent leur apoptose et diminuent la minéralisation de l'os (14).

II.4.4. La pneumonie nécrosante

La pneumonie nécrosante à *S. aureus* affecte le sujet jeune, sans facteur de risque. La mortalité est élevée. Le diagnostic précoce est difficile, avec dans un premier temps une clinique de syndrome pseudo-grippal qui évolue rapidement vers une détresse respiratoire sévère. Caractérisée par une leucopénie, une hémoptysie et une nécrose du poumon, elle est causée par des clones de *S. aureus* sécrétant la leucocidine de Panton Valentine (PVL). Cette toxine entraîne un fort recrutement des polynucléaires neutrophiles, une activation des cellules de l'immunité et la libération de cytokines pro-inflammatoires causant une inflammation dans le parenchyme pulmonaire, mais aussi une inflammation globale par diffusion sanguine des cytokines. La lyse des polynucléaires par la toxine libère des protéases et des molécules responsables du stress oxydatif, causant une altération des bronches avec nécrose et hémorragies. En plus de ce facteur de virulence toxinique, ces souches ont une sécrétion plus importante des facteurs d'adhésion, dont la Protéine A, lui permettant ainsi d'envahir plus facilement le poumon. L'altération de l'épithélium cilié pulmonaire,

notamment par une infection virale, favorise la pénétration de la bactérie dans le poumon (15, 16).

III. Physiopathologie de l'infection à *Staphylococcus aureus*

Le pouvoir pathogène de *Staphylococcus aureus* est lié à sa capacité à envahir l'hôte et à sécréter un nombre important et varié de facteurs de virulence. L'ensemble de ces propriétés permet la colonisation, la persistance, la dissémination au sein de l'hôte, le contournement du système immunitaire par la bactérie et apporte sa virulence. En fonction de la phase de croissance de la bactérie, on peut distinguer deux étapes : l'étape de colonisation ou d'envahissement impliquant des facteurs d'adhésion, des protéines de surface, des facteurs de contournement du système immunitaire ; et l'étape de virulence impliquant des toxines et des enzymes sécrétées par la bactérie (1).

III.1. La phase d'invasion

III.1.1. *Staphylococcus aureus* et le système immunitaire

- Le système immunitaire

La reconnaissance des micro-organismes est la première étape de défense de l'hôte. La réponse du système immunitaire face à la présence d'une bactérie entraîne la production et la sécrétion d'un grand nombre de cytokines et de chimiokines pro-inflammatoires, la migration des macrophages et des polynucléaires neutrophiles au site d'infection et la stimulation d'autres cellules comme les cellules épithéliales, endothéliales et les plaquettes. Les cellules agissent sur le pathogène à l'aide d'anticorps et du complément. Le complément est une famille de protéines qui a pour rôle de fixer des molécules effectrices sur les cellules infectées, ce qui les signale comme "à détruire". Les leucocytes peuvent phagocyter, tuer et dégrader les pathogènes. Les molécules résultant de cette dégradation sont présentées par les cellules présentatrices d'antigènes aux lymphocytes T, activant ainsi la réponse immunitaire adaptative avec différenciation des cellules B et sécrétion d'anticorps spécifiques (17).

Il est clair que ce système ne fonctionne pas normalement au cours des infections à *S. aureus*. Ce germe est un pathogène très adapté à l'hôte et sa pathogénicité est le résultat de centaines d'années de coexistence avec l'homme.

- Modulation du système immunitaire par *S. aureus*

La présence d'anticorps, retrouvée chez tous les humains, ne protège pas des infections à *S. aureus*. En effet, ce pathogène sécrète des protéines immunomodulatrices qui contrent l'action de l'immunité humorale et cellulaire. Le niveau d'anticorps et la mémoire immunitaire sont donc souvent trop faibles pour être efficaces en cas de réinfection. Ceci explique en partie les infections à répétition et les infections chroniques caractéristiques de ce germe.

Par exemple, la protéine A, protéine de surface exprimée par *S. aureus*, a un potentiel immunomodulateur. Sa liaison aux cellules B oriente ces dernières vers l'apoptose plutôt que vers la prolifération, diminuant ainsi la diversité des anticorps produits par l'hôte (4).

- Résistance à la phagocytose

La capacité de *S. aureus* à contrer chaque étape aboutissant à la phagocytose est un facteur important du succès de l'infection.

Dès la pénétration du pathogène dans l'organisme, de nombreuses molécules chimioattractantes sont libérées. Elles sont issues de l'action du complément ou de peptides produits par la croissance bactérienne. Elles sont spécifiquement reconnues par les polynucléaires neutrophiles même à faible concentration et permettent à ces derniers de s'activer et de migrer au lieu d'infection, c'est le mécanisme de chimiotactisme. Environ 60 % des souches de *S. aureus* sécrètent des protéines inhibitrices du chimiotactisme (CHIPS). Ces protéines lient fortement les récepteurs des molécules chimioattractantes situés à la surface des polynucléaires neutrophiles (4).

Les anticorps reconnaissent les composants de membrane tels que le peptidoglycane, l'acide lipotéchoïque et d'autres protéines de surface des bactéries. *S. aureus* possède une capsule polysaccharidique et produit des protéines anti-opsonisation associées aux protéines de surface qui interfèrent avec les anticorps et les voies du complément. La bactérie contre ainsi la reconnaissance par le système immunitaire et donc la phagocytose.

La protéine A est une protéine de surface avec 4 ou 5 domaines qui peuvent chacun lier la région Fc, région constante, des immunoglobulines. La formation de ces complexes ne permet plus aux anticorps d'activer les polynucléaires neutrophiles. Le clumping factor (ClfA) est également une protéine de surface, se liant au fibrinogène et donc protégeant la bactérie au sein d'un regroupement inaccessible aux cellules de la phagocytose. A l'opposé des autres protéines de surface majoritairement exprimée pendant la phase de croissance exponentielle de la bactérie, le clumping factor est présent pendant la phase stationnaire de croissance.

La capsule recouvre les protéines chimioattractantes, les fractions du complément et les anticorps fixés à la surface de la bactérie. Elle empêche leur reconnaissance par les cellules de l'immunité, et donc les mécanismes de phagocytose et d'opsonisation.

Le "*Staphylococcus* Complement Inhibitor" (SCIN), protéine sécrétée par *S. aureus*, empêche le clivage de la protéine C3 du complément. Il stoppe donc la boucle d'amplification du complément et ainsi bloque la phagocytose et la destruction des bactéries par les polynucléaires neutrophiles. La protéine liant le fibrinogène Efb (extracellular fibrinogen-binding protein), protéine extracellulaire, agit également sur la protéine C3 du complément en empêchant sa fixation à la surface de la bactérie.

D'autres mécanismes indirects protègent *S. aureus* de la phagocytose. La staphylokinase, enzyme sécrétée par *S. aureus*, active le plasminogène, formant de la plasmine qui clive les fractions du complément et les anticorps fixés à la surface de la bactérie. La formation de biofilm protège *S. aureus* en le rendant inaccessible aux éléments du système immunitaire. Il a également la capacité de se protéger au sein d'un thrombus par liaison et activation des plaquettes (4).

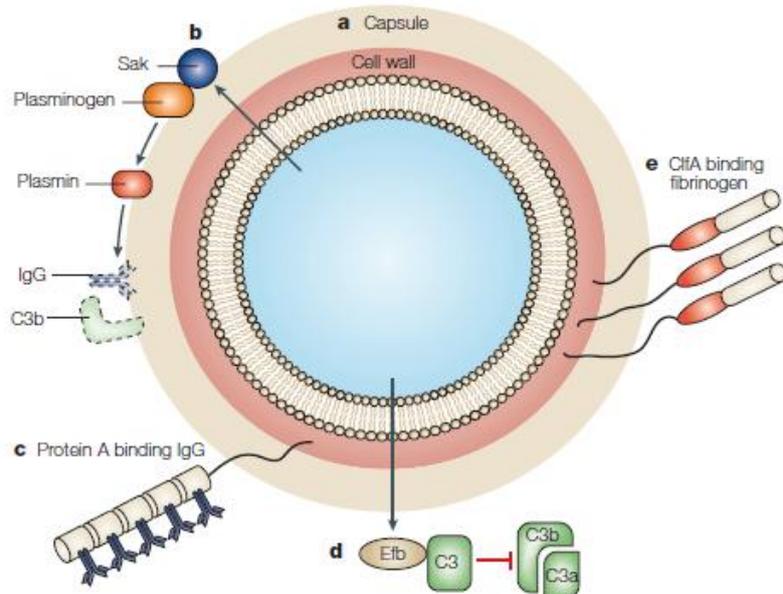


Figure 1 : Mécanismes permettant à *Staphylococcus aureus* d'éviter l'opsonisation [Foster T. 2005 (4)]

a) La capsule polysaccharidique empêchant l'accès des protéines chimioattractantes aux polynucléaires neutrophiles ; b) La staphylokinase, enzyme entraînant la formation de plasmine qui clive les éléments du complément et les immunoglobulines ; c) La protéine A qui forme des complexes avec les immunoglobulines bloquant leur activité ; d) La protéine liant le fibrinogène (Efb) qui bloque l'action de la fraction C3 du complément ; e) Le clumping factor (ClfA) qui par sa liaison au fibrinogène rend la bactérie inaccessible aux cellules de la phagocytose.

De plus, *S. aureus* sécrète des toxines qui altèrent les membranes des cellules de l'hôte détruisant ainsi les polynucléaires neutrophiles.

- Survie dans les phagosomes

Lorsque *S. aureus* est absorbé par les polynucléaires, il a la capacité de se modifier pour survivre dans le phagosome. Les modifications touchent les acides lipotéchoïques, le peptidoglycane et les phospholipides de la membrane et permettent de réduire l'affinité de la membrane de la bactérie pour les peptides antimicrobiens. Ces modifications permettent aussi à la bactérie de se protéger des protéines antimicrobiennes du sérum, comme la phospholipase A2 ou la lactoferrine. En dehors de modifications de structure, *S. aureus* se protège des peptides antimicrobiens cationiques en sécrétant des protéines qui les neutralisent, comme la staphylokinase ou l'auréolysine. L'auréolysine est une métalloprotéase extracellulaire clivant les défensines (4).

S. aureus présente une résistance innée au système de phagocytose, incluant une fusion avec l'endosome, l'échappement aux peptides antimicrobiens, la résistance au stress oxydatif, expliquant ainsi sa capacité à créer des infections récurrentes. Le pigment jaune de *S. aureus* est un caroténoïde qui contribue à sa résistance aux radicaux libres. La bactérie

exprime également deux enzymes à fonction superoxyde dismutase, permettant une résistance au stress oxydatif. *S. aureus* était dans un premier temps vu comme un pathogène extracellulaire mais sa capacité à survivre au sein des polynucléaires, des macrophages et des autres cellules non spécifiques de la phagocytose (cellules épithéliales et endothéliales), font de lui un pathogène également intracellulaire (4).

- Surexpression du système immunitaire

A l'inverse de ces diminutions de l'immunité, la clinique des infections à *S. aureus* peut parfois s'expliquer par une interaction excessive entre la bactérie et le système immunitaire. Le peptidoglycane fonctionne en synergie avec l'acide lipotéichoïque, autre composant essentiel de la paroi des staphylocoques, pour stimuler les monocytes et macrophages et entraîner la libération de cytokines pro-inflammatoires et de chimiokines, participant ainsi à la physiopathologie des sepsis. Au cours de pneumopathie à *S. aureus*, c'est également l'envahissement excessif du poumon par les polynucléaires et les macrophages et donc la libération importante de cytokines qui causent une altération des tissus (17). Au cours des chocs toxiques, c'est l'activation massive des lymphocytes T, suivie d'une phase d'immunosuppression, qui est responsable de la clinique (4).

III.1.2. Les facteurs de colonisation

S. aureus colonise la peau et les muqueuses en adhérant aux cellules et aux composants de la matrice extracellulaire. Cette adhérence permet d'initier l'infection et se fait par l'intermédiaire de protéines de surface qui facilitent l'attachement à la cellule hôte. Les protéines bactériennes se lient à la fibronectine des cellules épithéliales et endothéliales, au fibrinogène des tissus traumatiques ou au collagène, notamment au cours des infections ostéo-articulaires. Les facteurs d'adhérence permettent également à *S. aureus* d'être impliqué dans les infections sur matériel, que ce soit sur cathéter ou sur valve cardiaque (1).

Le peptidoglycane, large polymère et principal composant de l'enveloppe des bactéries Gram positif, est sensible à différentes enzymes. Chez *S. aureus*, sa capacité à résister au lysozyme, enzyme présente dans les sécrétions, permet à la bactérie de coloniser les muqueuses. Les acides lipotéichoïques interviennent également dans la colonisation, en particulier par leur partie hydrophobe orientée vers l'extérieur de la bactérie.

Les protéines d'adhésion, regroupées sous le nom de MSCRAMMs (microbial surface components recognizing matrix molecules), sont le plus souvent liées au peptidoglycane de la paroi cellulaire par leur partie C-terminale. La protéine A (Spa) est un exemple type de ces protéines. En plus de son activité anti-phagocytose, elle permet l'attachement de *S. aureus* au facteur de von Willebrand, retrouvé sur les épithéliums lésés et permet donc l'adhésion au début des infections intravasculaires. La protéine liant le collagène (Cna) permet l'adhésion de la bactérie au cartilage et intervient donc au cours des infections ostéo-articulaires et des endocardites. Le gène *cna*, codant pour cette protéine, est retrouvé chez 40 à 60 % des souches de *S. aureus*. Les protéines de liaison à la fibronectine (FnBPA et FnBPB) sont deux récepteurs codés par 2 gènes proches et permettent l'adhésion de la bactérie aux caillots plasmatiques et aux biomatériaux. Ils favorisent ainsi les infections sur corps étrangers, notamment dans les endocardites sur valve prothétique. La protéine de liaison au fibrinogène, également appelée clumping factor (ClfA) permet elle aussi la liaison aux caillots plasmatiques et aux corps étrangers, initiant notamment les infections sur plaies. Il existe une seconde protéine de liaison au fibrinogène (ClfB) qui, contrairement au clumping factor présent chez toutes les bactéries, n'est présent que pendant la phase de croissance exponentielle précoce de la bactérie ou lors de culture en anaérobie. La liaison de ces protéines au fibrinogène est régulée par le taux de calcium, ceci limitant la liaison dans le plasma mais favorisant la liaison dans les thrombus de plaquettes pauvres en calcium (18).

Différentes enzymes, produites par *S. aureus*, interviennent dans la virulence. Elles facilitent la destruction des tissus et la dispersion de la bactérie au sein de l'hôte. La staphylokinase, codée sur un bactériophage, est un activateur du plasminogène. Son activité protéolytique cause la dissolution des caillots de fibrine et donc la dispersion des bactéries présentes à l'intérieur. Les protéases, lipases et désoxyribonucléases permettent l'apport de nutriment à la bactérie. L'enzyme FAME (Fatty Acid Modifying Enzyme) modifie les acides gras et pourrait donc avoir un rôle dans les abcès en modifiant les lipides antibactériens (1).

III.2. Les toxines

S. aureus a la possibilité de sécréter un nombre important et varié de toxines, dont la plupart sont codées sur des éléments génétiques mobiles, expliquant la grande variabilité entre clones. Les éléments génétiques mobiles représentent environ 15 % des gènes de *S. aureus*

et contrairement aux gènes du génome de base, appelé "core-génome" et transmis verticalement, ces gènes peuvent être transmis verticalement aux bactéries dites filles et horizontalement à d'autres bactéries d'un clone identique ou différent. Les éléments génétiques mobiles sont des bactériophages, des plasmides, des îlots de pathogénicité, des transposons, ou la cassette chromosomique staphylococcal (SCC). Ils codent pour des gènes de résistance ou des gènes de virulence (19).

Seules quelques toxines sont associées à des symptômes spécifiques : les superantigènes associés au choc toxique et aux intoxications alimentaires, les exfoliatines associées aux syndromes cutanés et la leucocidine de Panton Valentine associée à la pneumonie nécrosante.

III.2.1 Les toxines formant des pores ou "Pore Forming Toxins" (PFTs):

Certaines toxines de *S. aureus* sont définies par leur action sur les cellules; Ce sont les toxines formant des pores, regroupant l' α -toxine, la β -hémolysine, la leucocidine de Panton Valentine (PVL), l'hémolysine γ ainsi que la δ -toxine et les Phenol-Solubles Modulines (PSMs) (19). Elles sont responsables d'une lyse cellulaire par fuite du contenu cytoplasmique et déséquilibre hydro-électrique (4). Souvent sécrétées sous forme de monomère, les toxines interagissent avec les facteurs lipidiques et protéiques de la cellule, se regroupent sous forme d'oligomère et forment ainsi un pore hydrophobe à l'origine de la lyse cellulaire (5). En fonction de leur structure tridimensionnelle, les toxines formant des pores sont classées en deux groupes, celles ayant une structure alpha, composée d'une hélice alpha hydrophobe (la δ -toxine et les PSMs) et celles ayant une structure en feuillets bêta se regroupant sous forme d'un pore en tonneau bêta (l' α -toxine, la γ -hémolysine et la PVL) (5).

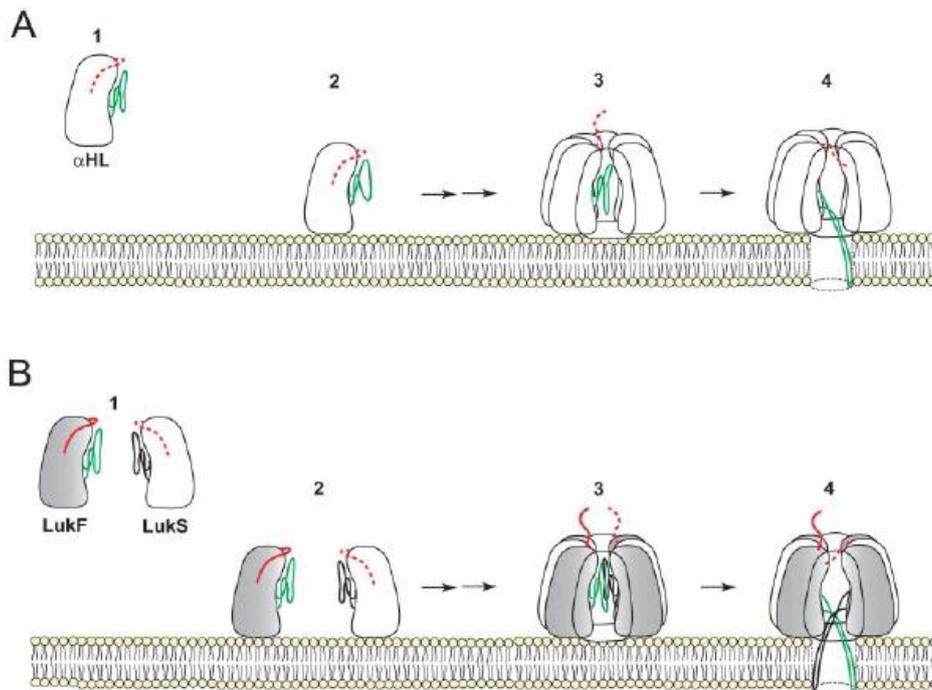


Figure 2 : Exemple d'assemblage des toxines formant des pores de type bêta [Miles G, *et al.* 2006 (20)]

A) L' α -toxine : liaison d'un monomère à la membrane plasmidique, assemblage sous forme d'heptamère formant le pré-pore puis insertion du pore définitif. B) La leucocidine : fixation du composant S à la membrane plasmidique puis du composant F, assemblage sous forme d'un pré-pore octamérique (4 composés S et 4 composés F) puis insertion du pore définitif dans la membrane.

- L' α -toxine

Le gène *hla* codant pour l' α -toxine est présent chez 95 % des souches de *S. aureus*. Situé au sein du core-génome, son expression est régulée par au moins 3 systèmes régulateurs, dont le système Agr mais aussi par des facteurs de l'environnement comme la température et l'oxygène. Elle est maximum en fin de phase exponentielle de croissance (7). L' α -toxine est un monomère soluble de 33 kDa qui, à faible concentration, se lie à un récepteur membranaire spécifique, l'ADAM10 (A Desintegrin And Metalloproteinase 10), se regroupe sous forme d'heptamère et entraîne la formation d'un pré-pore sur la membrane de nombreuses cellules de l'hôte (19, 21). Le pré-pore s'introduit dans la membrane, formant un canal de 14 Å de diamètre. Il y a alors fuite des molécules de moins de 2 kDa, altération de l'intégrité de la membrane et activation des signaux de stress cellulaire, entraînant la mort de la cellule. Les cellules cibles sont les cellules épithéliales, les érythrocytes, les monocytes, les macrophages, les plaquettes et les lymphocytes mais ne sont pas les polynucléaires neutrophiles. A haute concentration, la toxine interagit avec les lipides de membranes de manière non spécifique, formant des pores plus larges et entraînant un efflux rapide de potassium et autres petites molécules et un influx de sodium et calcium (7). Elle a

un effet non seulement sur les cellules infectées mais aussi sur les cellules avoisinantes par diffusion de la toxine (10).

L'implication de l' α -toxine en pathogénicité a été démontrée au cours des infections de la peau (abcès et infections des tissus mous) et des pneumopathies (19) où elle contribue notamment à la pénétration de la barrière épithéliale par la bactérie. Son action sur les cellules du système immunitaire entraîne une libération de cytokines et de médiateurs de la réponse inflammatoire, impliqués dans la physiologie du choc septique. La destruction des cellules endothéliales favorise la dissémination des bactéries et la formation de nouveaux foyers infectieux à distance.

- La β -hémolysine

La β -hémolysine est une sphingomyélinase C, enzyme de 35 kDa hydrolysant la sphingomyéline des phospholipides de la membrane cellulaire et ayant une action magnésium dépendante (7). Elle entraîne une déstabilisation de la bicouche lipidique et cause la mort cellulaire. Son action cytolytique est sélective se réalisant sur les monocytes mais pas sur les lymphocytes, les polynucléaires, ou les fibroblastes. Le gène *hly* codant pour la β -hémolysine, situé sur un locus d'insertion d'un bactériophage, est bloqué en cas de présence du bactériophage. Ainsi, même si la totalité des souches de *S. aureus* possède le gène, seul 10 % l'expriment (1, 22).

Sécrétée en phase post-exponentielle de croissance bactérienne, l'implication de la β -hémolysine en pathogénicité est faible.

- La δ -toxine et les PSMs

La δ -hémolysine ou δ -toxine est un petit peptide amphiphile de 26 acides aminés, en forme d'hélice alpha, codé par la majorité (97 %) des souches de *S. aureus*. Par liaison et agrégation à la surface des cellules, formation de pores transmembranaires, déstabilisation de la membrane plasmique et en agissant comme un détergent à forte concentration, cette toxine a une activité cytolytique, notamment sur les érythrocytes. Le gène *hly*, codant pour la δ -toxine est situé au sein même du gène *ARNIII*, appartenant au système de régulation Agr. L'expression de cette toxine se fait en fin de phase exponentielle de croissance (7, 23).

La δ -toxine est responsable de nombreux effets pathologiques. Elle a une activité pro-inflammatoire par des mécanismes directs (augmente les récepteurs du complément) et indirects (produit des radicaux oxygénés et favorise l'opsonisation) (23).

Les PSMs (Phenol-Solubles Modulines) sont également des petits peptides cytolytiques amphiphiles en hélice alpha. D'abord identifiés chez *Staphylococcus epidermidis*, ils sont de deux types chez *S. aureus* : les PSM-alpha, peptides de 20 à 26 acides aminés, et les PSM-béta, peptides de 43 à 44 acides aminés (5). Contrairement aux autres toxines, codées sur des éléments génétiques mobiles, les PSMs sont codés par des gènes situés dans le "core-génome" de la bactérie, ce n'est donc pas leur présence ou absence au sein d'une souche qui déterminerait sa virulence mais leur niveau d'expression. Leur production en grande quantité chez les souches de *S. aureus* d'origine communautaire, participerait au succès des infections par ces bactéries (24).

- La PVL et la γ -toxine

Les leucotoxines à deux composés incluent la γ -hémolysine (Hlg), la leucocidine de Panton Valentine (PVL), LukM-PV + LukF'-PV like (toxine rarement impliquée en pathologie humaine) et LukE-LukD, produite par environ 30 % des souches hospitalières de *S. aureus*. Ces toxines sont composées de deux protéines différentes, une de classe S, de 31 à 32 kDa, et une de classe F, de 34 à 35 kDa. Leur dénomination est liée à leur vitesse d'éluion en chromatographie par échange d'ions avec le composé S (Slow) qui est élué lentement et le composé F (Fast) qui est élué rapidement. Chacun de ces composés n'a pas d'activité par lui-même mais une action synergique entraînant la formation de pore dans la membrane des cellules cibles. Le composé S se fixe le premier sur la membrane, permettant la fixation du composé F puis les couples de toxines s'oligomèrisent pour former un pore octamérique (4 composés S et 4 composés F). Les protéines S déterminent la spécificité cellulaire de la toxine et peuvent se lier avec différentes protéines de classe F, formant ainsi des toxines différentes. Les effets cellulaires de ces toxines sont une activation de la voie calcique, une sécrétion de facteurs chimioattractants et de composés pro-inflammatoires (5, 6).

L'activité de la PVL a été mise en évidence en 1932 chez des souches de *S. aureus* responsables de furoncles (25) et c'est en 1936 que la toxine est elle-même découverte. Les deux composés de cette toxine sont LukS-PV et LukF-PV. Les gènes sont codés sur un

bactériophage, retrouvé chez moins de 5 % des souches cliniques de *S. aureus*. L'activité lytique de cette toxine est restreinte aux monocytes, macrophages et polynucléaires neutrophiles. Les érythrocytes ne sont pas lysés. Les souches productrices de PVL sont associées aux infections cutanées, notamment aux furoncles et aux abcès, mais également à des infections plus sévères, comme les pneumonies nécrosantes, les septicémies fulminantes et les ostéomyélites. Par contre elles ne sont pas associées aux pneumopathies acquises sous ventilation (6, 10).

La γ -toxine, présente chez 97 % des souches de *S. aureus*, affecte les polynucléaires neutrophiles, les monocytes et les érythrocytes. Les gènes, issus d'un même locus situé au sein même du génome bactérien, permettent de coder trois composés : un premier fragment code pour HlgB (composé F) et HlgC (composé S) et un autre pour HlgA (composé S). La γ -toxine est une combinaison d'un des composants S (HlgA ou HlgC) et du composant F (HlgB) (7).

III.2.2. Les superantigènes

S. aureus peut exprimer trois types de toxines à activité superantigène : les entérotoxines (SE, *Staphylococcal* Enterotoxin de SEA à SEI, SER et SET), les superantigènes entérotoxines like (SE-I, *Staphylococcal* Enterotoxin like de SE-I J à SE-I Q, SE-I S, SE-I U, SE-I V et SE-I X) et la toxine du choc toxique TSST-1. Ce sont des exoprotéines non glycosylées, de faible poids moléculaire (19 à 30 kDa), formée de 2 domaines en feuillets bêta et d'un domaine C-terminal similaire à un domaine liant les immunoglobulines. Ils sont synthétisés sous forme de pré-toxine et clivés au niveau de la séquence N-terminale lors de la sécrétion (9). Ces toxines sont résistantes à la chaleur, à la protéolyse donc à l'action de la trypsine digestive, ainsi qu'à l'acidité et à la dessiccation (8). Au moins un superantigène est sécrété par 80 % des souches de *S. aureus* et souvent c'est 5 ou 6 gènes codant pour différents superantigènes qui sont retrouvés (9).

Tous les superantigènes sont codés sur des éléments génétiques mobiles, sauf SE-I X (*Staphylococcal* Enterotoxin like X) qui est codé dans le chromosome de la bactérie. SEA (*Staphylococcal* Enterotoxin A) est codé par le gène *sea* situé dans un bactériophage et SED (*Staphylococcal* Enterotoxin D) par le gène *sed* situé sur un plasmide. Les autres superantigènes sont codés dans des îlots de pathogénicité (8), notamment TSST-1 qui est

codé par le gène *tst*, présent chez 20 % des souches de *S. aureus* (2). Les superantigènes sont régulés par les systèmes de régulation Agr, Sae, SarA, SigmaB, Rot et sont produits en fin de phase exponentielle de croissance (7).

Les superantigènes sont associés aux intoxications alimentaires et aux chocs toxiques. Le choc toxique est une pathologie potentiellement fatale au cours de laquelle l'activation d'un grand nombre de cellules T par le superantigène entraîne une surproduction de cytokines se concluant par une inflammation systémique et un état de choc (9). Les superantigènes forment un pont entre le domaine variable de la chaîne bêta ($V\beta$) des récepteurs TCR des lymphocytes T et les CMH-II (Complexe Majeur d'Histocompatibilité de type II) des cellules présentatrices d'antigènes, induisant une importante prolifération des cellules T ainsi qu'une activation des cellules présentatrices d'antigènes tels que les macrophages. Ceci entraîne un orage de cytokines, une production massive de TNF- α (Tumor Necrosis Factor alpha), d'IL-1 (Interleukine-1), d'IL-2 (Interleukine-2) et d'IFN- α (Interféron alpha), responsables des symptômes du choc toxique (8). L'activation des cellules T se fait normalement par une interaction entre le récepteur $\alpha\beta$ des cellules T (TCR) et le peptide présenté par le complexe majeur d'histocompatibilité de type II (CMH-II). Ce peptide bactérien issu de la digestion de la bactérie par les cellules présentatrices d'antigènes active environ 0,01 % des lymphocytes T. Les superantigènes reconnaissent eux la région $V\beta$ du TCR, région moins diversifiée avec environ 50 $V\beta$ différents dans le génome humain mais répartis de manière non proportionnelle. Ils peuvent activer jusqu'à 20 % des lymphocytes T, notamment TSST-1 qui est spécifique de la région $V\beta$ 2, région très fréquente sur les cellules T (9).

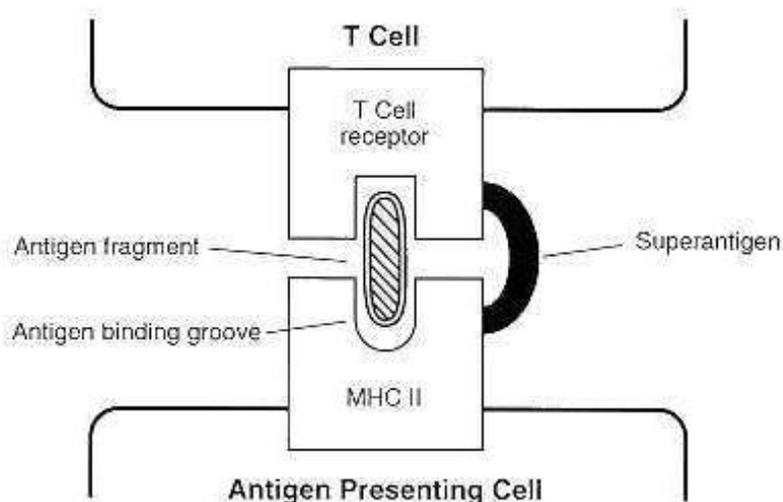


Figure 3 : Mécanisme d'action des superantigènes [Foster T. 1996 (1)]

Contrairement aux fragments d'antigènes présentés spécifiquement par le CMH-II (Complexe majeur d'histocompatibilité) des cellules présentatrice d'antigènes au TCR (Récepteur des cellules T), le superantigène forme directement un pont entre ces deux éléments et nécessite donc une plus faible spécificité.

Lorsqu'elles sont ingérées, les entérotoxines présentent une activité émétique qui n'existe pas pour TSST-1. La différence est liée à la présence d'une boucle cystéine retrouvée uniquement sur les entérotoxines. Les superantigènes sont classés en 5 groupes : le groupe I est représenté par la toxine du choc toxine (TSST-1) qui ne possède qu'un site de liaison au CMH-II et aucune activité émétique. Le groupe II comprend entre autres SEB (*Staphylococcal Enterotoxin B*) et SEC (*Staphylococcal Enterotoxin C*) et possède une boucle cystéine dans sa structure permettant l'activité émétique de ces toxines. Comme le groupe I, le groupe II n'a qu'un site de liaison au CMH-II. Le groupe III est représenté par SEA (*Staphylococcal Enterotoxin A*), SED (*Staphylococcal Enterotoxin D*) et SEE (*Staphylococcal Enterotoxin E*). Comme dans le groupe II, ces entérotoxines ont une boucle cystéine et une activité émétique. Ils possèdent deux sites de liaison au CMH-II dont un dépendant du zinc. La présence de deux sites de liaison permet de créer des ponts entre cellules présentatrices d'antigènes adjacentes, et d'augmenter l'activité superantigène. Le groupe IV correspond aux toxines de *Streptococcus pyogenes*. Le groupe V contient des superantigènes découverts plus récemment, notamment les entérotoxines like. Ils ont deux sites de liaison au CMH-II, pas de boucle cystéine mais une boucle supplémentaire de 15 acides aminés qui semble critique pour l'interaction avec le domaine V β du TCR (8, 26).

Les superantigènes des groupes I et II sont associés à des pathologies plus importantes, notamment car ils sont produits en quantité plus élevée (de l'ordre du ng/mL) que les superantigènes de classe III et V, produits en pg/mL (8).

III.2.3. Les épidermolysines

Les exfoliatines sont responsables des syndromes de la peau ébouillantée (SSSS : Staphylococcal Scalded Skin Syndrome). Ce sont des sérines protéases de 30 kDa qui hydrolysent spécifiquement les desmosomes de la couche superficielle de la peau, en clivant la desmogléine 1, cadhérine desmosale responsable de l'adhésion entre les cellules. Il existe plusieurs sérotypes. ETA (Exfoliatine Toxine A), formée de 242 acides aminés, est majoritaire en Europe, en Amérique et en Afrique. Codée par le gène *eta* localisé sur le chromosome, elle est présente chez 0,5 % à 3 % des souches de *S. aureus* sensibles à la méticilline et chez 10 % des souches de *S. aureus* résistant à la méticilline (19). ETB (Exfoliatine Toxine B), formée de 246 acides aminés, est codée sur un plasmide par le gène *etb* et est présente chez 0,5 % des souches (13). La spécificité de ces toxines pour la desmogléine 1 explique leur absence d'activité au niveau des muqueuses et des couches profondes dans lesquelles il est retrouvé de la desmogléine 3 qui compense les pertes de desmogléine 1 (12).

III.3. Physiologie : les systèmes régulateurs

III.3.1. Le quorum-sensing : *agr*

Les protéines de surface sont majoritairement exprimées pendant la phase exponentielle de croissance de la bactérie, alors que les exotoxines sont sécrétées pendant la phase stationnaire de croissance bactérienne. Cette répartition est le résultat de l'activation du régulateur global *agr* (accessory gene regulator) qui coordonne l'expression des gènes de *S. aureus* (2). Les régulateurs agissent en réponse à la densité cellulaire, à l'énergie disponible et aux signaux environnementaux (27). La coordination de ces actions permet la formation d'infections, avec dans un premier temps un petit nombre de bactérie exprimant les facteurs de surface comme la protéine A afin d'adhérer à l'hôte et de contrer le système immunitaire puis dans un second temps, lorsque le site devient pauvre en nutriments et que la densité cellulaire est importante, la sécrétion de facteurs de virulence permettant à la bactérie de se répandre dans l'organisme (28).

Le système *agr* est un quorum-sensing, permettant aux cellules de communiquer entre elles et s'activant en fonction de la densité bactérienne au sein du site d'infection. C'est un système à 2 composants dirigé par les promoteurs P2 et P3. L'opéron P2 code pour l'ARNII, composé de 4 protéines générant le mécanisme *agr*. L'opéron P3 code pour l'ARNIII, effecteur intracellulaire du système agissant sur les gènes cibles. Les transcrits ARNII et ARNIII sont en sens opposé sur le chromosome bactérien et séparés par 120 paires de base. Les ligands activant le système *agr* sont des peptides cycliques nommés AIP (auto-inductible peptide) composés de 7 à 9 acides aminés. Ils sont synthétisés sous forme de pro-peptides par la bactérie elle-même et codés par le gène *agrD* situé dans l'opéron P2. Leur sécrétion et leur maturation se font par le système d'export *AgrB*, protéine transmembranaire codée par le gène *agrB* lui aussi situé au sein de l'opéron P2. Leur quantité est représentative de la densité microbienne et ils apparaissent dans l'environnement au milieu de phase exponentielle de croissance bactérienne. Les AIP lient la partie N-terminale transmembranaire du récepteur *AgrC*, qui couplé à *AgrA* forment le système régulateur à 2 composants. *AgrC* et *AgrA* sont également codés dans l'opéron P2, par les gènes *agrC* et *agrA*. *AgrC* est une histidine protéine kinase, capable de fixer les AIP et *AgrA* est le régulateur réponse de ce système qui active les promoteurs P2 et P3. Cette boucle d'auto-amplification signe le passage de l'étape de croissance bactérienne exponentielle à l'état stationnaire. L'ARNIII, codé par l'opéron P3, a une structure secondaire complexe, fortement conservée entre les espèces de staphylocoques. Il augmente la transcription de la majorité des gènes codant pour des protéines extracellulaires et diminue la transcription des gènes codant pour des protéines de surface. Son mécanisme d'action n'est pas totalement connu. Il peut se faire par une liaison directe sur le promoteur des gènes cibles, par l'intermédiaire d'autres régulateurs, ou en affectant la stabilité des transcrits d'ADN par modifications allostériques. L'ARNIII agit également au niveau de la traduction de certains ARN messagers, notamment celui de l'hémolysine alpha et de la protéine A, empêchant leur traduction (27, 28, 29).

Les variations de séquence d'*agrB*, *agrD* et *agrC* ont permis d'identifier 4 groupes chez *S. aureus*. Le système d'export *AgrB* n'est pas spécifique d'un type d'AIP. Par contre, le récepteur *AgrC* est activé par les AIP de son groupe et inhibé par les autres. Le phénotype d'*agr* influence la pathogénicité, notamment la capacité de formation de biofilms (28). La

plupart des souches impliquées dans les chocs toxiques et certaines impliquées dans les pneumonies nécrosantes à PVL appartiennent au groupe III d'*agr*, alors que celles productrices d'exfoliatines sont préférentiellement du groupe IV (27).

III.3.2. les autres régulateurs

Les autres régulateurs permettent à la bactérie de répondre aux signaux de l'environnement différents de la densité bactérienne.

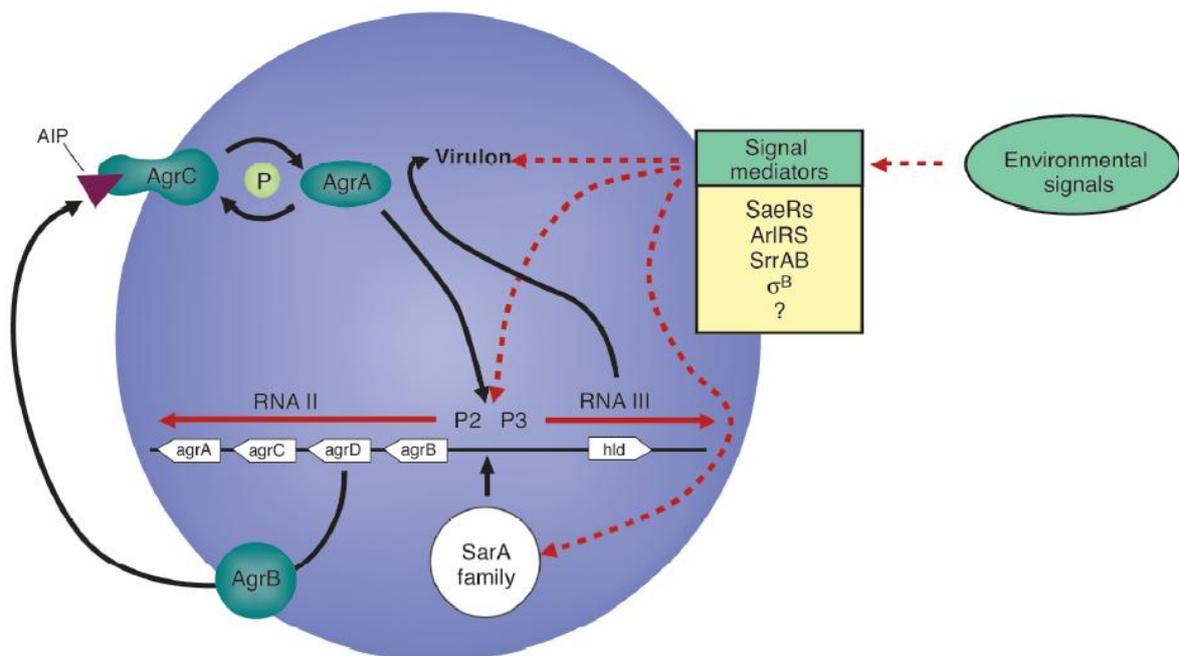


Figure 4 : Régulation des facteurs de virulence chez *Staphylococcus aureus* [Yarwood JM, et al. 2003 (28)]

Le système *agr* (*accessory gene regulator*) est composé de l'opéron P2 qui code pour l'ARNII et de l'opéron P3 qui code pour l'ARNIII, effecteur intracellulaire agissant directement ou indirectement sur l'expression des facteurs de virulence. L'ARNII permet la synthèse des composants du système : AgrD, pro-peptides sécrétés par AgrB et transformés en AIP (auto-inductibles peptides). Les AIP activent le récepteur AgrC couplé à AgrA qui lui-même active la transcription des opérons P2 et P3. D'autres régulateurs, influencés par des facteurs environnementaux, agissent sur la transcription des facteurs de virulence, soit directement, soit par l'intermédiaire du système *agr*.

- *SaeRS*

SaeRS est un système à 2 composants qui réagit à la salinité, le pH et le taux de glucose de l'environnement ainsi qu'à la présence d'antibiotiques en concentrations sub-inhibitrices. Il régule les gènes des protéines impliquées dans l'adhésion et l'invasion telles que la protéine A, la protéine liant le fibrinogène, la protéine liant la fibronectine et les gènes codant pour les hémolysines. Il inhibe le système *agr*, atténuant la virulence des infections en modèle murin. Il apparaît au début de la phase exponentielle de croissance bactérienne et disparaît en phase post-exponentielle (30).

- ArIRS

ArIRS est un système à 2 composants qui contre l'auto-induction d'*agr*. Il est impliqué dans la formation des biofilms et dans l'activité autolytique. Son absence entraîne une augmentation de transcription de l'opéron P2 d'*agr*. Il est responsable d'une diminution de synthèse des exoprotéines, probablement par diminution d'*agr* (28).

- SrrAB

SrrAB (Staphylococcal respiratory response) est un système à 2 composants qui inhibe l'expression d'ARNIII mais qui est également inhibé par *agr*. Il régule les gènes impliqués dans le métabolisme énergétique et permet notamment à *S. aureus* de croître en anaérobiose en favorisant les facteurs nécessaires au métabolisme et en réprimant la synthèse des facteurs de virulence. Lors d'une croissance dans un milieu pauvre en oxygène, *srrAB* est surexprimé à toutes les phases de croissance de la bactérie avec un maximum en fin de phase exponentielle, diminuant ARNIII. Ce système serait la cause de la plus faible virulence des SCVs (Small Colony Variant), souches de *S. aureus* retrouvées au cours d'infections profondes et chroniques. Ces SCVs expriment plus faiblement leur catalase, leur coagulase et leurs hémolysines. La sécrétion de la toxine du choc toxique TSST-1 uniquement en aérobiose est également liée à ce régulateur qui, par inhibition d'ARNIII, inhibe la transcription du gène *tst* en cas de faible niveau d'oxygène. A l'inverse, il favorise la synthèse de protéine A (31).

- Le facteur Sigma(B)

Le facteur alternatif Sigma(B) répond au stress de l'environnement, au manque d'énergie ou à des stimuli tels que la présence d'éthanol ou d'acide salicylique dans le milieu. Son action est régulée par un chemin post-transcriptionnel complexe impliquant d'autres régulateurs. Il contre l'action d'*agr* en augmentant l'expression de toxines dès la phase exponentielle de croissance, soit indirectement par l'intermédiaire d'autres régulateurs, soit directement pour les gènes dont le promoteur est dépendant de sigma(B). Il est impliqué dans la production du pigment jaune or de *S. aureus*. En pratique, l'absence de sigma(B) affecte peu la virulence mais diminue la capacité de formation de biofilms (27).

- SarA et ses homologues

SarA (staphylococcal accessory regulator A) et ses homologues appartiennent à la famille des protéines régulatrices liant l'ADN. Ce sont des protéines de faible poids moléculaire avec un

haut pourcentage de résidus chargés. Ils sont nécessaires à l'action d'*agr* (32) et agissent sur de nombreux facteurs de virulence mais également sur une grande variété de gènes avec des actions accessoires. Ils ont une structure en double hélice, capable de lier l'ADN. Parmi ces protéines, *sarA* peut être transcrit par 3 promoteurs : *sarP1*, *sarP2* et *sarP3* qui sont actifs à différents moments de la croissance bactérienne. Parmi les homologues de *SarA*, *SarR* est une protéine de 113 acides aminés qui en se liant sur le promoteur de *sarA* diminue son expression. *SarA* se lie aux régions riches en bases AT, incluant les régions 5' de nombreux gènes. Des régions de liaison de *SarA* sont présentes entre les promoteurs *P2* et *P3* d'*agr*, suggérant une coopération de ces deux systèmes. La liaison de *SarA* et d'*AgrA* entre les deux promoteurs entraîne une modification de cette région qui induit la transcription des opérons, alors que la présence de *SarR* conserve la liaison mais empêche le changement conformationnel donc la transcription des gènes (33). *SarA* augmente la transcription de certains gènes, notamment l'opéron *P2* et *P3* mais aussi *fnbA*, le gène codant pour les récepteurs à la fibronectine, *tst*, le gène de la toxine du choc toxique et *hla*, le gène de l' α -toxine. Il diminue la transcription d'autres gènes tels que *cna*, le gène codant pour la protéine liant le collagène. *SarA* est nécessaire à l'activation de *saeRS* et *arlRS*, probablement par son action sur *agr* (27).

SarS est un homologue de *SarA* qui est exprimé à un taux quasiment indétectable en présence d'*agr* et de *SarA*. En l'absence de ces deux facteurs qui sont ses répresseurs, il favorise la synthèse de la protéine A. Ainsi la diminution de transcription du gène *spa*, gène de la protéine A, par le système *agr* serait liée à une inhibition de son activateur *SarS* (34). *SarT* est un homologue de *SarA* qui diminue la transcription de l' α -toxine. En fin de phase exponentielle de croissance, *sarT* est inhibé par *agr* et *SarA*, favorisant ainsi la production d' α -toxine. *SarA* agit également directement sur *hla*, le gène de l' α -toxine (35). *Rot* (repressor of toxins), autre homologue de *SarA* a une activité qui contre celle d'*agr*. Il régule négativement l'expression de protéines telles que les protéases, la lipase, les uréases et les hémolysines, toutes impliquées dans l'invasion des tissus. Par contre *rot* régule positivement des gènes de protéines de surface impliqués dans l'adhésion, comme la protéine A. Il contribue aussi à la régulation de gènes non impliqués en pathogénicité que ce soit des gènes du métabolisme, de synthèse des composants de parois ou de transport (36).

III.3.3. Régulation globale des toxines

Chaque gène peut être sous l'influence de plusieurs régulateurs avec des effets différents qui font que le gène n'est exprimé qu'au moment optimal. Le système *agr* répond à la densité cellulaire mais en cas d'énergie ou de nutriment insuffisants, les autres systèmes de régulation vont diminuer la synthèse des exoprotéines afin de maintenir les fonctions vitales de la bactérie. Ainsi en présence d'un milieu de culture acide, d'éthanol ou d'antibiotiques en concentrations sub-inhibitrices, la synthèse de la toxine du choc toxique TSST-1 et de l'hémolysine alpha est diminuée, alors que celle des protéases et de la protéine A est augmentée (27).

Le système *agr* s'auto-induit grâce aux AIP et interagit avec les autres systèmes à deux composants. Des boucles d'amplification ou d'inhibition existent entre les différents régulateurs, notamment entre ARNIII et *sarA* ou ses homologues. L'ARNIII augmente la transcription de nombreux facteurs, comme la toxine du choc toxique TSST-1, les hémolysines, ou encore la PVL, entraînant une augmentation de leur sécrétion en phase post-exponentielle de croissance. A l'inverse, il régule négativement l'expression d'enzymes (protéases, lipase), l'expression du gène de la résistance à la pénicilline *mecA* et surtout la synthèse de protéine de surface (protéine A, protéine liant la fibronectine, coagulase). En l'absence d'ARNIII, Rot et SarT ont une action inhibitrice sur le gène *hla* de l' α -toxine alors que Rot et SarS ont une action positive sur *spa*, gène de la protéine A (29). Rot a un effet opposé au système *agr*, à la fois sur les gènes de virulence mais également sur SarS, favorisant son action (36).

L'exfoliatine ETA est diminuée par les régulateurs Sigma(B), SarA et SarS, alors que l'exfoliatine ETB est diminuée par Sigma(B), SarA mais pas par SarS. La transcription de ces deux toxines est augmentée par SaeRS, ArlRS et AgrA. Ainsi la production d'ETA est à son maximum pendant la phase de croissance exponentielle car l'augmentation d'AgrA en phase post-exponentielle est contrée par l'action de Sigma(B) et la diminution de SaeRS (37).

IV. Les Phenol-Solubles Modulines (PSMs), particularités

IV.1. Structures

IV.1.1. Les PSMs : structure primaire et génétique

Les Phenol-Solubles Modulines (PSMs) ont été décrits la première fois par Klebanoff en 1999 (38). Ces peptides retrouvés dans la phase phénol lors d'extractions de surnageants de culture de *Staphylococcus epidermidis*, ont montré une capacité à résister à la chaleur (15 minutes à 100°C entraînent une perte partielle d'activité et 60 à 120 minutes entraînent une perte totale), et une activité sur les cellules, notamment les monocytes (38). La séparation des PSMs de *S. epidermidis* montre deux types de composants : PSM α composé de 22 acides aminés avec un poids moléculaire de 2460 Da et présentant une homologie de structure avec la δ -toxine de *S. aureus* et PSM β composé de 44 acides aminés avec un poids moléculaire de 4639,3 Da. PSM γ , retrouvé chez *S. epidermidis* mais absent chez *S. aureus*, est composé de 25 acides aminés, avec un poids moléculaire de 2820,4 Da et sa structure est proche de celle de la δ -toxine de *S. aureus* avec seulement 2 bases de différence entre les gènes (38). Chez *Staphylococcus carnosus*, quatre types de PSMs sont décrits : PSM α , PSM β , PSM γ et PSM δ (39). Chez *S. aureus*, l'utilisation d'une chromatographie liquide haute performance en phase inversée avec détection par spectrométrie de masse, suivi d'un séquençage, a permis d'identifier 6 peptides assimilés à des PSMs. 4 de ces peptides sont courts, environ 20 acides aminés et de type alpha : PSM α 1, PSM α 2, PSM α 3 et PSM α 4 et 2 sont longs, environ 40 acides aminés et de type bêta : PSM β 1 et PSM β 2. Les gènes codant les PSMs, présents chez l'ensemble des souches de *S. aureus*, sont répartis dans 2 clusters différents situés dans le core-génome de la bactérie, l'opéron alpha codant pour les 4 PSM α et l'opéron bêta codant pour les 2 PSM β (40). Chez *Staphylococcus lugdunensis*, 3 peptides de type PSM β sont décrits : SLUSH (*Staphylococcus lugdunensis* synergistic hemolysin) de type A, B et C. Composés d'environ 43 acides aminés, ils sont codés par le *slush* opéron, présent dans le génome bactérien et régulés par le système *agr* (41).

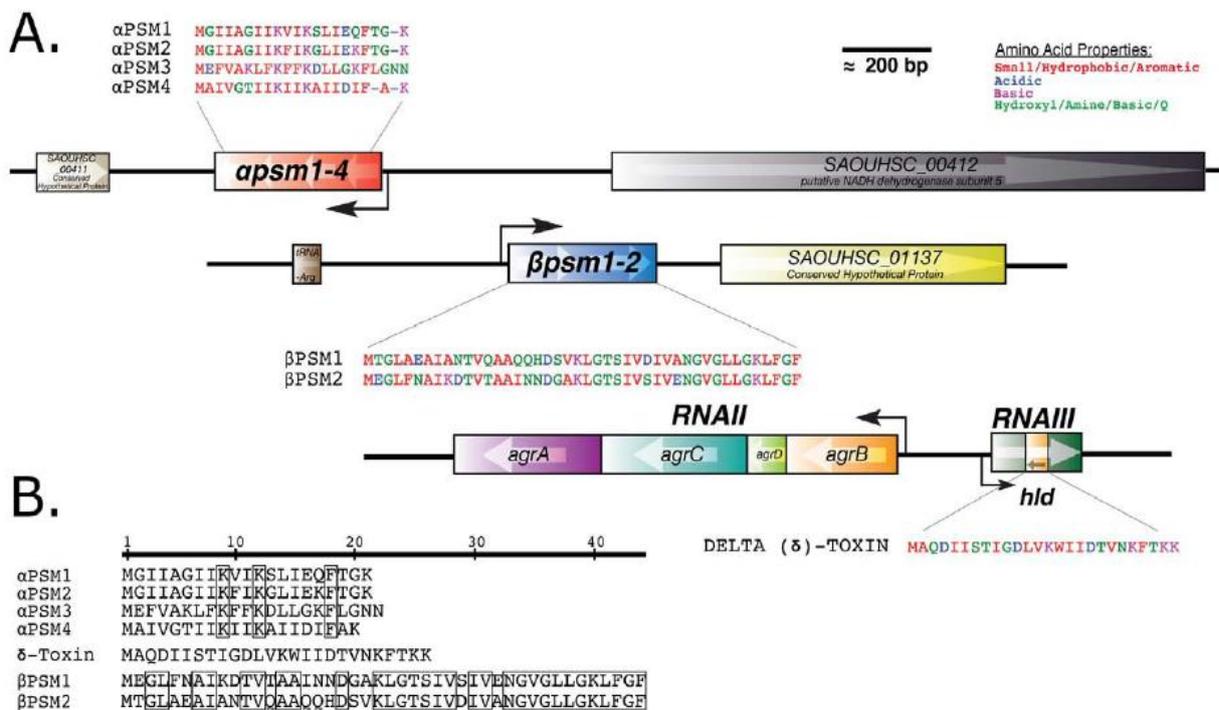


Figure 5 : PSMs chez *Staphylococcus aureus* : gènes et structures [Schwartz K et al. 2012(42)]

A) Les gènes sont situés sur le génome de *Staphylococcus aureus*. Les PSMs sont codés par 2 opérons : l'opéron α codant pour 4 PSM α et l'opéron β codant pour 2 PSM β . Le gène de la δ -toxine est situé au sein même du gène de régulation RNAIII. B) Structures des PSMs : ce sont de petits peptides de 20 à 22 acides aminés pour les PSM α et de 44 acides aminés pour les PSM β .

IV.1.2. Les PSMs : structure tertiaire et système d'export

Les PSMs sont donc une famille de peptides, présents chez l'ensemble des Staphylocoques mais différents au sein de chaque espèce, avec une structure en hélice alpha (43) et des propriétés type surfactant grâce à leur caractère très amphiphile. Ils sont sécrétés sous forme formylés mais peuvent être déformylés en fonction de l'activité peptide déformylase du milieu de culture (41). Leur export au niveau extracellulaire se fait par un transporteur spécifique, composé d'une cassette liant l'ATP, lui-même régulé par le système *agr*. Ce transporteur Pmt (Phenol-Soluble Moduline Transporteur) est codé par 4 gènes : *pmtA*, *pmtB*, *pmtC* et *pmtD*. Il est composé de deux parties séparées par la membrane, PmtB et PmtD et de deux ATPases, PmtA et PmtC. Ce transporteur est essentiel à la survie des bactéries qui sécrètent des PSMs car son absence entraîne une accumulation de PSMs dans le cytosol et une lyse de la bactérie par ses propres toxines. De plus, ce transporteur protège *S. aureus* des autres PSMs potentiellement présents dans l'environnement comme ceux de *S. epidermidis* (44).

IV.1.3. PSM-mec

En plus des PSMs chromosomiques, certains *S. aureus* présentent un PSM de type α codé par le gène *psm-mec* situé dans la cassette SCCmec, cassette chromosomique codant la résistance à la pénicilline. C'est l'unique toxine de *S. aureus* codée dans cette cassette. Elle est associée aux cassettes de type II, IIA, IIB, IID et III principalement et plus rarement sur les cassettes de type VIII (45). Contrairement aux autres PSMs, PSM-mec a dans sa structure un résidu cystéine mais qui ne semble pas avoir d'action particulière, notamment il ne permet pas la dimérisation du peptide (24). La quantité de PSM-mec sécrétée est très variable en fonction des souches, sans lien avec le type de cassette. Par contre il y a une corrélation entre le taux de PSM-mec produit et celui de PSM α (46).

IV.1.4. Les dérivés de PSMs

Des dérivés de PSMs, correspondant à des PSMs tronqués, ont récemment été identifiés chez *S. aureus*. Ils sont nommés dPSM α 1 et dPSM α 4 en fonction de leur forme parente et présentent une activité différente de celle de la forme initiale (47). Chez *S. epidermidis*, des dérivés de PSM α 1 et PSM α 2 sont également identifiés (48). L'auréolysine est une métalloprotéase zinc dépendante, sécrétée par la bactérie pour cliver ses propres protéines de paroi cellulaire et elle aurait la capacité de cliver les PSMs en dPSMs, protéines à activité différente, notamment moins cytolytiques (47).

IV.1.5. L'auréolysine

Le gène *aur*, codant pour l'auréolysine, est un gène essentiel pour la bactérie, très conservé entre les espèces avec un polymorphisme faible ne permettant de distinguer que deux allèles différents chez *S. aureus*. De plus, les allèles codent pour des protéines structurellement proches et avec des niveaux d'activité similaire en termes d'affinité pour les substrats (49). L'auréolysine est composée d'une chaîne unique de 301 acides aminés avec un domaine N-terminal en feuillet bêta et un domaine C-terminal en hélice alpha. Les deux domaines sont reliés par une hélice alpha centrale et cette protéine a la capacité de lier un ion zinc ainsi que deux ions calcium. Le site de liaison au substrat se fait par l'intermédiaire de l'ion zinc et par le résidu Glu (acide glutamique) en position 145 (50).

L'auréolysine, la sérine protéase et la cystéine protéase sont des protéases cellulaires, également appelées autolysines, sécrétées par la bactérie elle-même afin de renouveler ses protéines de paroi. En effet, chez les souches mutantes produisant une grande quantité de protéases cellulaires, les niveaux d'expression des protéines liant la fibronectine et de la protéine A sont diminués. L'ajout d'un inhibiteur de protéase remonte le niveau d'expression des protéines de paroi (51). A l'inverse, la perturbation de la synthèse de la membrane cellulaire, c'est-à-dire une altération du peptidoglycane, induit une répression des systèmes autolytiques tels que l'auréolysine. Ce phénomène est notamment retrouvé au cours de l'utilisation de β -lactamines, antibiotiques agissant sur la paroi bactérienne (52).

IV.2. PSMs et virulence

IV.2.1. PSMs et niveau d'expression

Produits par toutes les souches de staphylocoques, les PSMs sont sécrétés à plus forte concentration chez les clones de *S. aureus* résistant à la méticilline d'origine communautaire, ceci pouvant être une explication à leur virulence, notamment pour le clone USA300, clone épidémique aux Etats-Unis (40). Les ostéomyélites à *S. aureus* résistant à la méticilline d'origine communautaire sont plus aiguës et plus sévères que celles à *S. aureus* résistant à la méticilline d'origine hospitalière. Au cours de ces infections, la capacité de *S. aureus* à avoir une virulence intracellulaire est un facteur déterminant de l'évolution de la pathologie. Les PSMs pourrait donc être le déterminant intracellulaire, responsable de la plus forte virulence des souches communautaires dans les infections ostéo-articulaires (53).

IV.2.2. Activités pro-inflammatoire et cytolytique

Les PSMs, ont une activité pro-inflammatoire sur différentes cellules, notamment les THP-1, monocytes humains utilisés en laboratoire, sur lesquels ces toxines entraînent une activation de la production de TNF- α (Tumor Necrosis Factor alpha), d'IL-1 β (Interleukine 1 β) et d'IL-6 (Interleukine 6) (38). Les PSMs, principalement les PSM α , ont la capacité de recruter, activer et lyser les polynucléaires neutrophiles, éliminant ainsi le principal mécanisme de défense de l'hôte et favorisant l'envahissement par la bactérie. Sur ces cellules, ils induisent la libération d'IL-8 (Interleukine 8) mais pas celle de TNF- α , ni d'IL-1 β . L'activité des PSMs est très spécifique du type de cellule et l'augmentation de TNF- α observée dans les modèles

bactériens n'est pas directement liée à l'effet des PSMs mais est indirectement la conséquence d'une activation cellulaire (40). Au cours des pathologies impliquant les PSMs, l'accumulation de neutrophiles et leur sécrétion de dérivés oxygénés et d'enzymes protéolytiques, entraînent des dommages cellulaires (54, 55).

Les PSMs ont une activité cytolytique. La présence de PSM α 3 dans un milieu de culture altère les polynucléaires neutrophiles en seulement 5 minutes, avec des signes d'altération de la membrane puis une lyse complète en 60 minutes (40). Les PSM α lysent également les érythrocytes et les autres types de leucocytes avec une activité plus importante pour PSM α 1, PSM α 2 et PSM α 3 (56). De plus les PSMs, surtout PSM α 3 potentialisent l'action lytique de la PVL sur les polynucléaires neutrophiles (57) et la β -hémolysine potentialise l'action de la δ -toxine et de PSM-mec sur les érythrocytes (56). Chez *S. epidermidis*, PSM δ a un fort pouvoir cytolytique, équivalent à celui de PSM α 3 chez *S. aureus*. Ils forment des pores dans la membrane des cellules cibles grâce à leur structure en hélice alpha amphiphile. La structure en hélice alpha est essentielle pour l'activité cytolytique mais non suffisante étant donné que d'autres PSMs ont la même structure mais pas d'activité cytolytique. La principale différence entre *S. aureus* et *S. epidermidis* est la répartition des PSMs. Chez *S. aureus*, la majorité est de type alpha, donc cytolytique, alors que chez *S. epidermidis*, 50 % sont de type bêta (58).

En modèle animal, une réduction de la mortalité chez la souris est observée en cas d'infection par une souche délétée en PSM α et la mort de la souris est plus lente en cas d'infection par une souche délétée en δ -toxine. La quantité de TNF- α produite se retrouve également abaissée dans ces situations. La taille des lésions cutanées de la souris est diminuée au cours des infections par des souches délétées en PSM α . Ce sont les PSM α , et en particulier PSM α 3, qui ont une fonction essentielle dans la pathogénicité pro-inflammatoire de ces peptides. Dans un modèle de péritonite chez la souris, l'infiltration et la lyse des polynucléaires neutrophiles sont significativement augmentées en cas d'infection par la souche non délétée par rapport à la souche délétée en PSM α , prouvant l'activité cytolytique des PSM α (40). En modèle animal chez le lapin, la lyse des polynucléaires neutrophiles et la taille des abcès sont corrélées au niveau d'expression des

PSM α . PSM α 3 est le plus actif et seules les formes formylées présentent une activité lytique (59).

IV.2.3. Activité intracellulaire

L'activité des PSMs peut être inhibée en présence de sérum par interaction antagoniste avec les lipoprotéines. Par contre, l'activité intracellulaire est toujours conservée avec notamment la capacité à lyser les cellules qui ont phagocytées la bactérie (60). Le passage en intracellulaire de *S. aureus* lui permet d'échapper au système immunitaire et favorise la dissémination de la bactérie dans l'organisme. Les PSMs ont la capacité de lyser les cellules phagocytant la bactérie depuis les compartiments intracellulaires. Ils détruisent la membrane de l'endosome et permettent à *S. aureus* de se développer dans le cytoplasme à l'abri du système immunitaire (61). L'expression des PSMs est associée à une cytotoxicité sur les ostéoblastes, ceci par action intracellulaire de ces toxines (53).

IV.2.4. Adhésion et dissémination

Les PSM β n'ont pas d'impact ni sur les lésions cutanées, ni sur la lyse des polynucléaires neutrophiles (40). Ils contribuent à la formation de biofilms et à la dissémination des infections. Les biofilms sont un facteur clé de la virulence des staphylocoques. Ils augmentent la résistance de la bactérie face aux traitements antibiotiques et au système immunitaire. Ce sont des structures multicellulaires, composées d'une matrice de protéines, de polysaccharides, d'ADN extracellulaires, et d'autres facteurs. La composition du biofilm varie en fonction des souches, de leur stade physiologique et de la disponibilité des nutriments. Le caractère amphiphile des PSMs structure les biofilms, leur donnant des propriétés d'interaction entre les cellules et créant des canaux à l'intérieur. Ces canaux sont essentiels à la survie du biofilm, permettant aux cellules les plus profondes de recevoir des nutriments et à la bactérie de se maintenir. Lorsqu'ils sont exprimés en grande quantité, les PSMs permettent le désassemblage du biofilm et des morceaux se détachent de la structure initiale, favorisant la dissémination de la bactérie. Les PSMs ont donc un rôle essentiel dans le contrôle du switch entre le mode quiescent et agressif de l'infection (42, 62, 63, 64).

La présence des PSMs chez l'ensemble des staphylocoques laisse penser que leur rôle initial n'était pas lié à la virulence. La production de ces peptides à propriété surfactant, permet dans un premier temps à la bactérie d'adhérer et de coloniser les surfaces épithéliales (62).

IV.2.5. Activité de PSM-mec

PSM-mec est un PSM de type alpha avec une activité pro-inflammatoire et cytolytique. Ses activités de chimiotactisme et d'activation des polynucléaires neutrophiles sont inférieures à celles de PSM α 3 mais égale à celles des autres PSM α . Sa capacité à entraîner la production d'IL-8 est équivalente à celle des autres PSMs. Sa capacité à lyser les polynucléaires neutrophiles est moindre que celle des autres PSM α mais sa capacité à lyser les érythrocytes est équivalente (24). Sa présence chez des souches ayant une faible production de PSM α chromosomique a un impact sur la virulence, effet notamment démontré dans des infections cutanées sur modèle murin (46). L'effet de PSM-mec sur les biofilms et l'adhésion de la bactérie est faible (24).

IV.2.6. Activité des dérivés des PSMs

Les PSMs tronqués ont une activité différente de celle du peptide initiale. Ils ont une activité antimicrobienne ciblant les autres bactéries à Gram positif, qui contribuerait à la colonisation de *S. aureus* au niveau de la peau, notamment à sa lutte contre *S. epidermidis*. L'activité cytolytique et l'activation des polynucléaires neutrophiles par ces dérivés est absente ou faible (47). Chez *S. epidermidis*, des dérivés de PSM α 1 et PSM α 2 ont montré avoir une activité antimicrobienne, notamment anti *Streptococcus pyogenes* mais également anti *Micrococcus luteus* (48).

IV.3. Mécanisme d'action

Les PSMs agissent sur les polynucléaires neutrophiles selon deux mécanismes d'action en fonction de leur niveau d'expression.

IV.3.1. Action FPR2 dépendante

A des concentrations de l'ordre du nanomolaire, les PSMs ont la capacité de stimuler et d'attirer les polynucléaires via les récepteurs FPR2 (Formyle Peptide Récepteur de type 2). La

liaison des PSMs aux FPR2 entraîne la production de radicaux oxygénés par activation de la NADPH oxydase (Nicotinamide Adenine Dinucleotide Phosphate Oxydase), la libération d'IL-8 (Interleukine 8) et une action immunomodulatrice (54, 65). Ces récepteurs permettent donc aux polynucléaires neutrophiles d'ajuster leur réponse en fonction de l'agressivité de la souche de staphylocoque infectante (41). Par contre le récepteur FPR2 n'est pas impliqué dans l'activité cytolytique des PSMs (66).

IV.3.2. Les récepteurs FPR2

Les Formyle Peptide Récepteurs (FPR) sont des récepteurs pour les molécules chimioattractantes. Leur activation entraîne la migration des polynucléaires neutrophiles au site d'infection. Ce sont des récepteurs à 7 domaines transmembranaires couplés à la protéine G, composés d'une seule chaîne polypeptidique de 350 à 370 acides aminés. La partie N-terminale et les trois boucles extracellulaires sont essentielles à l'interaction avec les ligands. La partie C-terminale et les trois boucles intracellulaires sont essentielles à la transmission du signal (54). Les FPRs humains sont de 3 types : FPR1, codé par le gène *fpr* situé sur le chromosome 19, FPR2 codé par le gène *fpr1* également sur le chromosome 19 et FPR3. FPR1 et FPR2 sont exprimés à la surface de nombreuses cellules dont les monocytes, les macrophages, les polynucléaires neutrophiles et les cellules dendritiques immatures, alors que FPR3 est spécifique des monocytes et macrophages (41). FPR1 a une haute spécificité pour les peptides formylés bactériens et possède un rôle majeur dans la reconnaissance des bactéries par l'hôte. Au contraire FPR2 a une affinité plus faible pour les peptides formylés mais il peut reconnaître un nombre important et varié de peptides amyloïdes et de molécules endogènes, comme les peptides de défense de l'hôte. De plus, FPR2 est sensible aux agonistes anti-inflammatoires. Son activation peut aboutir à une action pro-inflammatoire ou anti-inflammatoire. Ce récepteur est impliqué dans les maladies inflammatoires chroniques et dégénératives. FPR2 est également la cible des PSMs, avec une reconnaissance indépendante du groupement formylé de l'extrémité N-terminal (66).

IV.3.3. Action FPR2 indépendante

A des concentrations de l'ordre du micromolaire, les PSMs ont une action cytolytique par destruction de la membrane des polynucléaires neutrophiles. Cet effet cytolytique serait indépendant de tout récepteur et causé par les propriétés détergentes de l'hélice alpha

amphiphile des PSMs, qui faciliteraient leur interaction avec les membranes biologiques et la formation de pore dans les membranes (56). Cette action est facilitée et peut s'observer à de plus faibles concentrations en cas de membrane déjà altérée par l'effet pro-inflammatoire dépendant des récepteurs FPR2 (65).

IV.4. Régulation

Les PSMs ayant une activité pro-inflammatoire, il est crucial pour la bactérie de sécréter ces toxines à un moment où elle peut inactiver les cellules immunes. Les PSMs sont finement contrôlées par le système du quorum-sensing *agr*. Une absence de sécrétion de PSMs est retrouvée chez les souches délétées en *agr* (67). Ce mécanisme de régulation limite la sécrétion des toxines jusqu'à ce que les molécules signales atteignent une haute concentration, régulant les gènes en fonction de la densité bactérienne. Ainsi le système *agr* empêche la production de PSMs lorsqu'elles mettent en péril la survie de la bactérie et favorise leur production lorsqu'elles sont utiles à la pathogénicité, en phase de croissance lente, fin de la phase exponentielle de croissance bactérienne (40, 67). La régulation des PSMs entraîne une diminution de l'activation des polynucléaires neutrophiles par les récepteurs FPR2 au cours de la phase initiale de l'infection et à l'inverse une augmentation des récepteurs aux molécules chimioattractantes en phase d'expression d'*agr*. La libération des peptides formylés reconnus par FPR1 n'est pas influencée par le système de régulation *agr* (68). Le système d'export Pmt des PSMs est également régulé par *agr* (44).

Contrairement aux autres toxines, la production de PSMs n'est pas corrélée au niveau d'expression d'ARNIII, suggérant une régulation *agr*-dépendante, directement sous le contrôle d'AgrA et indépendante d'ARNIII (40). L'action d'AgrA se fait directement par liaison sur les promoteurs des opérons *psmA* et *psm β* . Les régions spécifiques de liaison ont été identifiées en comparant les séquences des promoteurs des PSMs avec celles des promoteurs P2 et P3 (69). PSM-mec présente un système de régulation identique à celui des autres PSMs (46).

La δ -toxine est codée au sein même du gène régulateur ARNIII. La présence de δ -toxine indique l'activation du quorum sensing et sa production commence environ 2 heures après celle des autres PSMs (67).

La production de PSMs est également régulée positivement par le système SarA et indépendante du système SaeRS. SarA n'a pas un impact direct sur l'expression des PSMs mais il diminue leur dégradation post sécrétion en diminuant l'expression de l'auréolysine, protéase de *S. aureus* dégradant les PSMs (53, 70).

V. *Staphylococcus aureus* résistant à la méticilline (SARM)

V.1. Emergence et définition de la résistance

Staphylococcus aureus s'adapte rapidement aux pressions de l'environnement. La résistance à la pénicilline par transfert d'une pénicillinase plasmidique apparaît dans les années 1940, moins de 4 ans après la première utilisation de ce traitement. A la fin des années 1960, 80 % des souches sont résistantes et actuellement plus de 90 % des *S. aureus* expriment cette enzyme (71). En 1960, une nouvelle β -lactamine semi-synthétique, la méticilline, active sur les staphylocoques malgré la présence de pénicillinase est utilisée en thérapeutique. Moins d'un an après, une souche de *S. aureus* résistante est décrite en Angleterre chez une patiente hospitalisée pour une surinfection de plaie (72).

La résistance à la méticilline est liée à la synthèse de PLP2a (Protéine Liant la Pénicilline de type 2a) et confère une résistance à toutes les β -lactamines (pénicillines et céphalosporines). Les PLP sont des transpeptidases, nécessaires à la liaison des chaînes de peptidoglycane et à la stabilité de la paroi bactérienne. La PLP2a se substitue aux autres PLP, joue le même rôle dans la synthèse de la paroi mais par sa faible affinité aux β -lactamines entraîne une résistance de *S. aureus* à ces antibiotiques (71).

V.2. Support génétique de la résistance à la méticilline

La résistance à la méticilline est liée à la présence d'un gène *mecA* codant pour les PLP2a. Ce gène de résistance est porté par un élément génétique mobile particulier appelé *staphylococcal cassette chromosome mec (SCCmec)*. L'intégration ou l'excision de la cassette dans le chromosome bactérien se fait par l'intermédiaire de deux recombinaisons : *ccrA* et *ccrB* (*cassette chromosome recombinase*), qui reconnaissent des séquences répétées aux extrémités de la cassette. Elles entraînent une insertion de la cassette dans un site

spécifique : *attB_{SCC}* et facilitent le transfert horizontal de la résistance. Toutes les cassettes sont insérées selon la même orientation et au même endroit dans le chromosome bactérien, au niveau de l'OrfX (Open Reading Frame ou phase ouverte de lecture X), codé par le gène *orfX* et de fonction inconnu. Ce site d'insertion est proche de l'origine de réplication du chromosome bactérien, ce qui apporte un avantage à la résistance bactérienne, lui permettant d'être synthétisée rapidement et favorisant sa probabilité d'être présente dans de nombreuses copies (73). En plus du gène *mecA*, la cassette contient un îlot de pathogénicité *IS431mec* facilitant l'acquisition d'autres résistances et des régulateurs : *mecI* et *mecR1*, qui sont responsables d'une expression phénotypique hétérogène de la résistance. *MecI* code pour la protéine répresseur de transcription *MecI* et *mecR1* code pour la protéine signal de traduction *MecR1*. Ces deux gènes régulent la transcription du gène *mecA*. *MecR1* détecte la présence de β -lactamines avec son domaine extracellulaire et active son domaine cytoplasmique comme une protéase. Elle clive alors *MecI*, le répresseur lié à la région opérateur du gène *mecA*, permettant alors la libération et la transcription du gène (74). Le reste de la cassette, nommé région J (pour Junkyard) contient des gènes non essentiels à la bactérie, notamment des gènes de résistances à d'autres antibiotiques ou de résistances aux métaux lourds, intégrés par des plasmides ou des transposons (75).

Il existe plusieurs types de *SCCmec* différentes par leur taille et leur séquence nucléique. 4 classes (A, B, C et D) sont différenciées en fonction des structures, 11 types en fonction du gène *mec* et des recombinases puis de nombreux sous-types en fonction de la région J (76). La cassette de type I, isolée dans les années 1960, est composée de 34364 paires de base et ne porte pas de gène de résistance à d'autres antibiotiques. Les cassettes de type II et III, isolées dans les années 1980, sont les cassettes historiques des SARM hospitaliers. Respectivement de 53017 et 66896 paires de bases, elles portent des gènes de résistance à de nombreux autres antibiotiques, tels que le plasmide pUB110 codant pour une résistance aux aminosides, le transposon Tn554 codant pour une résistance à l'érythromycine et le plasmide pT181 codant pour la résistance aux tétracyclines. Chez les SARM communautaires, les cassettes sont de type IV, plus petites (21000 à 24000 paires de base) et peu associées à des résistances autres que celle aux β -lactamines (73, 75).

V.3. Epidémiologie

V.3.1. Les SARM en France

L'épidémiologie mondiale et la répartition des différents clones de SARM varient en fonction des zones géographiques. En France, le clone majoritairement impliqué en pathologie humaine est le clone "Lyon", suivi de 4 clones dits minoritaires, le clone "Pédiatric" dit classique, le clone "Pédiatric" dit nouveau, le clone "Géraldine" et le clone Européen (77).

Le clone "Lyon" est un clone hospitalier, ayant émergé en France au début des années 1990. Il a remplacé l'ancien clone Ibérique, porteur d'une cassette *SCCmec* de type I. En typage MLST (Multilocus Sequence Typing), méthode basée sur le séquençage de 7 gènes de ménage de *S. aureus*, le clone "Lyon" a un génotype ST8 et il porte une cassette *SCCmec* de type IV. Il est résistant à la méticilline et aux fluoroquinolones mais contrairement aux SARM historiques, il est sensible à la gentamicine (78).

Le clone "Géraldine" est producteur de TSST-1, toxine du choc toxique et il est fréquemment impliqué dans les chocs et les infections suppuratives mais également dans des infections profondes comme les endocardites (79). Il est associé à des infections communautaires dans moins de 50 % des cas. C'est un clone ST5 porteur d'une cassette *SCCmec* particulière, dite de type I tronquée en cours de séquençage. En plus de sa résistance à la méticilline, il présente une résistance à l'acide fusidique. La résistance aux fluoroquinolones n'est pas constante (80, 81).

Le clone "Pédiatric" a été identifié la première fois au Portugal en 1992, puis en fonction de différences sur la cassette *SCCmec*, il a été subdivisé en 2 groupes, le clone dit classique porteur de *SCCmec* de type IV et le clone dit nouveau porteur de *SCCmec* de type VI. En plus de sa résistance à la méticilline, il est résistant aux fluoroquinolones mais toujours sensible aux aminosides.

Le clone Européen ST80 est un SARM communautaire, porteurs des gènes de la PVL. Responsable d'infections sévères de la peau et des tissus mous, de pneumonies fatales et d'infections ostéo-articulaires, sa prévalence en France est en augmentation (estimée à moins de 1 % entre 2000 et 2003 (82) et à 3,6 % en 2007 (77)). Il est majoritaire dans d'autres pays, tels que l'Algérie (83). Il est porteur d'une cassette chromosomique de type IV

et présente un phénotype de résistance particulier avec une résistance à l'acide fusidique, à la kanamycine et aux tétracyclines.

V.3.2. SARM communautaire (CA-MRSA)

Avant 1990, les infections à SARM étaient habituellement hospitalières, touchant des patients aux âges extrêmes, immunodéprimés ou atteints de maladies chroniques, mais depuis une vingtaine d'année, on voit émerger des souches qui ont la capacité d'infecter des patients sains, sans facteurs de risque, en dehors de l'hôpital. Ces clones dits communautaires combinent la résistance à la méticilline et des facteurs de virulence. Le gène de résistance à la méticilline de ces clones présente la particularité d'être plus petit (type IV ou V) et mieux adapté à la survie de la bactérie (84). Parmi ces SARM communautaires, le clone américain USA300 (ST8, *SCCmec* de type IV) s'est particulièrement bien répandu, envahissant tout le nord de l'Amérique (85). Les manifestations cliniques les plus fréquentes sont des infections de la peau et des tissus mous mais également des infections ostéo-articulaires, des pneumonies et des sepsis. La virulence de ces souches est supérieure à celle des clones hospitaliers et semble être liée à la présence de facteurs de virulence spécifiques tel que la PVL mais également au niveau d'expression d'éléments du génome tels que les $PSM\alpha$ et l' α -toxine, sous le contrôle d'un système de régulation *agr* très actif (86, 87).

VI. Antibiotiques anti-*Staphylococcus*

VI.1. β -lactamines

Les β -lactamines et principalement les dérivés de méticilline (oxacilline) restent l'antibiotique de choix pour le traitement des infections à *S. aureus* sensible. Par fixation aux PLP (Protéines Liant les Pénicillines) présentes sur la paroi des bactéries, ces antibiotiques entraînent un arrêt de synthèse du peptidoglycane et donc un effet bactéricide rapide. Chez *S. aureus*, il existe 4 types de PLP dont PLP2 et PLP3 qui sont essentielles à la liaison des chaînes de peptidoglycane et à la division de la bactérie. PLP4 semble moins importante avec un rôle dans la liaison secondaire des chaînes de peptidoglycane. Toutes les β -lactamines ne lient pas les 4 types de PLP. L'oxacilline, pénicilline semi-synthétique du groupe M, est non

sélective liant PLP1, PLP2 et PLP3 (88). L'imipénème, appartenant à la famille des carbapénèmes, lie préférentiellement la PLP1 (89, 90).

VI.2. Glycopeptides

La vancomycine est le traitement de référence de *S. aureus* résistant à la méticilline. Elle a un effet bactéricide lent par inhibition de la synthèse et de l'assemblage des polymères de peptidoglycane de la paroi bactérienne. Son spectre d'action est spécifique des bactéries à coloration de Gram positive. Introduit en thérapeutique en 1956, son utilisation s'est retrouvée fortement augmentée avec l'émergence de staphylocoques résistants aux β -lactamines. Sa très faible biodisponibilité orale et son activité temps-dépendant oblige l'injection parentérale en perfusion prolongée de ce traitement (91).

VI.3. Linézolide

Le linézolide est une oxazolidinone utilisée en thérapeutique sur les staphylocoques résistants à la méticilline. Son utilisation entraîne une inhibition de synthèse protéique par action sur la sous-unité 50s du ribosome bactérien. Il présente une bonne diffusion tissulaire lui permettant d'être utilisé dans les infections de la peau mais également dans les pneumonies et les infections profondes. Son effet inhibiteur de synthèse protéique en fait un traitement de choix dans les infections liées aux toxines (92).

VI.4. Rifampicine

La rifampicine est un antibiotique bactéricide par inhibition de l'ARN polymérase ADN dépendante. Il bloque l'initialisation de la synthèse d'ARN mais pas l'élongation. Son effet synergistique avec la vancomycine et sa bonne diffusion dans les tissus et les organes en font un traitement de choix des infections ostéo-articulaires. L'utilisation de cet antibiotique ne doit jamais se faire en monothérapie sous peine d'observer une acquisition rapide de résistance chez les germes traités (91).

VI.5. Fluoroquinolones

Les quinolones sont un groupe hétérogène d'antibiotiques bactéricides. Initialement dérivées de l'acide nalidixique, les nouvelles quinolones, appelées fluoroquinolones, présentent un spectre élargi. Ces antibiotiques agissent par inhibition de la réplication de l'ADN bactérien en ciblant l'ADN gyrase et la topoisomérase IV. Leur très bonne diffusion dans les tissus et les organes, leur possibilité d'être administrées par voie orale et leurs faibles effets indésirables en ont fait un antibiotique de choix dans de nombreuses infections, en monothérapie ou en association. L'acquisition de résistance est malheureusement rapide (91).

VI.6. Clindamycine

La clindamycine appartient à la famille des lincosamides, antibiotiques apparentés aux macrolides. Elle a un effet bactériostatique par inhibition de la croissance bactérienne en agissant sur la sous-unité 50s du ribosome bactérien. Elle a donc un effet inhibiteur de synthèse protéique important au cours du traitement d'infections liées à des toxines. Des résistances par altération de la cible sont décrites, liée à l'acquisition d'un gène nommé *erm* par la bactérie (91).

VI.7. Tigécycline

La tigécycline est une glycylicycline, dérivée de la minocycline. Elle agit par liaison sur la sous-unité 30s du ribosome bactérien, inhibant ainsi la synthèse protéique et la croissance bactérienne. Son effet est bactériostatique mais sa bonne diffusion et la rareté de résistance à cet antibiotique en font une bonne alternative thérapeutique (92).

VII. Impact des antibiotiques sur l'expression des toxines

VII.1. Impact sur la PVL

En plus de leur effet bactéricide ou bactériostatique, les antibiotiques peuvent avoir une action directe sur la production de toxines par les souches de *S. aureus*.

Différentes études ont montré l'effet inhibiteur de la clindamycine, du linézolide, de la tigécycline (93, 94) et de la rifampicine (95) sur la PVL. *In vitro*, ces trois antibiotiques entraînent une diminution de la quantité de toxine présente dans les milieux de culture mais également une diminution de la transcription du gène, illustrée par une diminution d'ARNm ou une diminution de l'activité d'une enzyme co-transcrite. Au cours d'études sur modèle animal (pneumonie nécrosante chez le lapin), une diminution de la mortalité parallèle à une diminution de la PVL dans le poumon a été retrouvée au cours de traitement par linézolide par rapport au traitement par vancomycine (96). En clinique, la supériorité d'un traitement avec un antibiotique dit anti-toxinique a été montrée par différentes études. Des cas de guérison de pneumonies nécrosantes sévères supposées ou confirmées à *S. aureus* sécréteurs de PVL, grâce à l'instauration d'un traitement associant la clindamycine ou le linézolide sont décrits. La rapidité d'instauration du traitement anti-toxinique semble être un élément clé de la guérison (97, 98).

En opposition à ces inhibiteurs de toxines, certaines β -lactamines entraînent une augmentation de la sécrétion de PVL. L'augmentation de la production de PVL par l'oxacilline et l'imipénème a été montrée au cours d'étude *in vitro* (augmentation dans les surnageants de culture) mais également sur modèle animal (augmentation dans le poumon de souris infectées). Elle est parallèle à une augmentation d'ARNm, en faveur d'une influence de l'antibiotique sur les gènes codant pour la toxine. Cette augmentation retrouvée uniquement avec les β -lactamines agissant par l'intermédiaire de la PLP1 semble être liée à une action de ces antibiotiques sur les systèmes de régulation SarA et Rot. En effet, une augmentation de l'ARNm de SarA, inducteur de la transcription des gènes codant pour la PVL, et une diminution de l'ARNm de Rot, inhibiteur de la transcription des gènes codant pour la PVL, est retrouvée en présence de ces deux antibiotiques (90). *In vitro*, La

combinaison de différents antibiotiques, notamment l'ajout de clindamycine, inhibe l'augmentation causée par l'oxacilline (95).

Enfin, d'autres antibiotiques tels que la vancomycine, la daptomycine et l'ofloxacine n'ont pas influencé l'expression et la sécrétion de la PVL (93, 95).

VII.2. Impact sur les autres toxines

L'influence des antibiotiques sur l'expression des toxines n'est pas spécifique à la PVL. En effet, d'autres toxines sont inhibées en présence d'antibiotiques dits anti-toxiniques : la protéine A (93, 99, 100), les hémolysines (101, 102), la TSST-1 (103, 104) et les entérotoxines (105). Ces antibiotiques, clindamycine, linézolide et tigécycline, agissent par diminution de la transcription (diminution de l'ARNm au cours d'études *in vitro*) mais également par inhibition de synthèse protéique en lien avec leur mécanisme d'action sur le ribosome bactérien (105). *Agr* est le régulateur central de la transcription des gènes codant pour les toxines mais des études montrent que l'influence des antibiotiques se fait probablement par l'intermédiaire d'autres régulateurs tels que SarA (99).

Comme pour la PVL, les β -lactamines augmentent l'expression des hémolysines, de TSST-1 et de la protéine A (100, 101, 102). L'augmentation de l'activité des hémolysines observée en culture sur gélose au sang, est confirmée par analyse de la quantité d'hémolysines présente dans les surnageants de culture *in vitro* et corrélée à une augmentation de l'ARNm (106).

La vancomycine n'entraîne pas de variation des gènes codant pour les toxines, que ce soit les hémolysines ou la TSST-1 (101).

VII.3. Impact sur les PSM-alpha

Concernant les PSM α , seules deux études recherchant l'influence des antibiotiques sur ces toxines ont été publiées et les résultats ne correspondent pas à ceux observés pour les autres toxines. En effet la première étude de Joo HS *et al.*, (107) montre une augmentation des PSMs en présence de tétracycline, de clindamycine, de linézolide et une diminution en présence d'oxacilline. Les variations de quantité de PSMs correspondent aux variations d'ARNm des gènes codant pour ces toxines. Les modifications se font préférentiellement sur

PSM α 1 et PSM α 2. La seconde étude, par Yamaki J *et al.*, (108) analyse l'effet de la clindamycine et d'un antibiotique de la famille du linézolide (TR-700). A l'inverse de la première étude, une forte diminution de la quantité de PSM α dans les milieux de culture est observée en présence de TR-700 et de clindamycine à 1/2 de la concentration minimale inhibitrice (CMI). Sur certaines souches, les auteurs décrivent une légère induction par la clindamycine à 1/4 et 1/8 de la CMI.

Au final, la discordance entre ces deux études ne permet pas de conclure quant à l'effet des antibiotiques sur l'expression des PSM α . L'hypothèse d'un mécanisme *agr* dépendant est évoquée mais les variations d'ARNIII et d'AgrA parfois concordante avec les variations d'ARNm ne semblent pas pouvoir expliquer à elles seules le mécanisme par lequel les antibiotiques agiraient (108).

Problématique

A la fois commensal et pathogène, *S. aureus* est responsable d'un nombre important et varié d'infections. La virulence de ce germe repose sur son aptitude à neutraliser le système immunitaire, notamment par l'intermédiaire de toxines sécrétées. Certaines toxines sont responsables de pathologies définies (syndrome d'exfoliation, choc toxique, toxi-infection alimentaire) mais la plupart interviennent dans un mécanisme global de virulence responsable de pathologies plus ou moins sévères (infections de la peau et des tissus mous, infections ostéo-articulaires). Parmi les toxines, les PSMs sont des peptides sécrétés par l'ensemble des *S. aureus*. En fonction de leur niveau d'expression, elles ont une activité pro-inflammatoire par l'intermédiaire de récepteurs spécifiques (FPR2) ou une activité cytolytique non spécifique. Cette activité pouvant s'exprimer en intracellulaire, les PSMs pourraient donc être impliquées dans les infections ostéo-articulaires. La présence de PSMs à un niveau élevé chez les *S. aureus* résistants à la méticilline (SARM) d'origine communautaire pourrait être une explication à la forte virulence de ces souches.

Certains antibiotiques utilisés au cours des infections staphylococciques ont montré leur capacité à moduler l'expression de facteurs de virulence, tel que la PVL et la toxine du choc toxique. Les antibiotiques diminuant l'expression de ces toxines sont dits anti-toxiniques et leur utilisation au cours d'infections sévères à *S. aureus* apporte un bénéfice au pronostic du patient. A l'inverse d'autres antibiotiques augmentent l'expression des toxines. A ce jour, seules deux études concernant la modulation de l'expression des PSM α par les antibiotiques ont été publiées et les résultats obtenus par les deux équipes sont discordants. De plus, les souches utilisées pour ces études étaient des souches de SARM appartenant aux clones diffusant aux Etats-Unis qui ne correspondent pas aux clones épidémiques en France.

Dans ce contexte où la place des PSM α dans la virulence de *S. aureus* devient indiscutable, où l'utilisation d'antibiotiques dits anti-toxiniques est courante, et où les données de la littérature sont manquantes, nous nous sommes demandés quel est l'impact d'antibiotiques à concentrations sub-inhibitrices sur l'expression des PSM α chez des SARM appartenant aux clones diffusants en France.

Partie Expérimentale

I. Matériels et méthodes

I.1. Souches bactériennes

Quatre souches de SARM ont été utilisées pour notre étude, deux appartenant au clone "Géraldine" et deux appartenant au clone "Lyon". Ces souches nous ont été fournies par le Centre National de Référence des staphylocoques (Lyon, France) et sont identifiées sous les numéros : HT20030749, HT20050614 pour les souches du clone "Géraldine" et HT20040012, HT20061175 pour les souches du clone "Lyon".

Afin de réaliser la mise au point de la méthode de dosage des PSM α , nous avons utilisé deux souches mises à notre disposition par BA Diep (San Francisco, Etats-Unis), la souche SF8300 appartenant au clone USA300 et son mutant délété en PSM α : SF8300 Δ *psm-alpha 1-4*.

Numéro de Souche	Clone	Description
HT20030749	Géraldine	CC5, SCCmec I tronquée, <i>agr 2</i>
HT20050614	Géraldine	<i>α-psm+</i> , <i>tst+</i> , <i>sec+</i> , <i>sed+</i>
HT20040012	Lyon	CC8, SCCmec IV, <i>agr 1</i>
HT20061175	Lyon	<i>α-psm+</i> , <i>sea+</i> , <i>sed+</i>
SF8300	USA300	CC8, SCCmec IV, <i>agr 1</i> , <i>α-psm+</i> , <i>pvl+</i> , <i>seb+</i> , <i>sek+</i> , <i>seq+</i>
SF8300 Δ <i>psm-alpha 1-4</i>	USA300	CC8, SCCmec IV, <i>agr 1</i> , <i>α-psm-</i> , <i>pvl+</i> , <i>seb+</i> , <i>sek+</i> , <i>seq+</i>

CC, Clonal Complex; SCCmec, type de cassette SCCmec; *agr*, groupe allélique d'*agr*;
 α -psm, gène des Phenol-Soluble Modulines alpha; *tst*, gène de la toxine du choc toxique; *sea*, *sec*, *sed*, gènes des entérotoxines A, C et D.

Tableau 1 : Description des souches utilisées pour l'étude

I.2. Antibiotiques et détermination des Concentrations Minimales Inhibitrices (CMI)

Les antibiotiques étudiés étaient la clindamycine, la tigécycline et le linézolide fournis par Pfizer® (Amboise, France), la vancomycine, la rifampicine, l'ofloxacine et deux β -lactamines, l'oxacilline et l'imipénème, achetés chez Sigma Aldrich® (L'Isle-d'Abeau, France).

Les Concentrations Minimales Inhibitrices (CMI) des 4 souches ont été déterminées par la méthode standardisée de dilution en microplaque, selon les recommandations du Comité de l'Antibiogramme de la société Française de Microbiologie (CA-SFM). Un inoculum à 0,5 MacFarland dilué au 1/100^{ème} dans du bouillon cœur cerveau (BHI-T), commercialisé par bioMérieux®, a été incubé 24 heures à 37°C en présence de dilutions successives de l'antibiotique à tester. Cette technique a été réalisée en double sur chaque souche et pour chaque antibiotique.

I.3. Culture bactérienne

Chaque souche a été cultivée sans antibiotique et en présence d'antibiotique à 1/2, 1/4 et 1/8 de la CMI préalablement déterminée.

Les souches ont été repiquées la veille sur gélose TSS (gélose trypticase-soja avec 5 % de sang de mouton), commercialisée par bioMérieux®, et après 24 heures de culture, une suspension à 0,5 MacFarland dans du BHI-T a été réalisée. Afin d'atteindre une phase exponentielle de croissance bactérienne, cette suspension a été incubée pendant 30 à 40 minutes à 37°C sous agitation, jusqu'à atteindre une concentration bactérienne de 1 MacFarland. A ce moment-là, l'antibiotique a été rajouté en quantité nécessaire en fonction de la concentration souhaitée (1/2, 1/4 ou 1/8 de la CMI) et un tube témoin sans antibiotique a été également réalisé. Les quatre tubes représentant quatre conditions de culture ont été incubés 6 heures à 37°C sous agitation. Pour chaque souche et chaque antibiotique, ces cultures ont été réalisées en double.

Aux temps 0, 2 heures, 4 heures et 6 heures, une DO (densité optique) du milieu a été mesurée par absorbance avec le spectrophotomètre V-1200 de VWR®. Aux temps 2 heures, 4 heures et 6 heures, un dénombrement bactérien a été mesuré en ensemençant un

échantillon du bouillon de culture sur gélose TSS. Les dénombrements ont été réalisés avec l'aide du dilueur-ensemenceur easySpiral Dilute de Interscience®. Le nombre de colonies par boîte a été compté après 24 heures d'incubation à 37°C. Les dénombrements et la mesure de la DO ont permis de réaliser des courbes de croissance bactérienne afin de confirmer l'effet sub-inhibiteur des antibiotiques utilisés.

Après 6 heures de culture, chaque échantillon a été centrifugé à 4500 tours par minute pendant 10 minutes et le surnageant a été collecté. Le culot bactérien a été nettoyé par lavages successifs dans du tampon TrisHCl à 10 mM, préparé extemporanément à partir de la solution Trizma® hydrochloride de Sigma®, et les culots ont été conservés après homogénéisation à 3 MacFarland.

Une autre culture bactérienne dans les mêmes conditions, mais sur 24 heures au lieu de 6 heures, a été réalisée pour chacun des antibiotiques sur les 4 souches de l'étude, nous permettant ainsi de récupérer des surnageants de culture après 24 heures d'incubation.

I.4. Quantification de l'ARNm PSM α 1/2 et PSM α 3

A partir des culots bactériens obtenus et sélectionnés, nous avons lysé les bactéries par la lysostaphine à 200 μ g/mL (Sigma®) et réalisé une extraction de l'ARN transcrit en utilisant le kit d'extraction RNeasy® Plus Minikit de Quiagen®. Les extraits d'ARN obtenus ont été dosés au spectrophotomètre micro-volume NanoDrop (Thermo Scientific®) afin de vérifier la qualité de l'extraction, de connaître leur concentration en ARN et pour ajuster les différents échantillons d'ARN à la concentration de 100 ng/mL.

L'obtention de l'ADN complémentaire a été faite par retrotranscription avec le kit Reverse Transcription System commercialisé par Promega® et selon le protocole établi par le fabricant. A partir de l'ADN complémentaire, l'expression de différents gènes a été étudiée. Pour cela des PCR en temps réel ont été réalisées avec le kit Light Cycler fast Start DNA Master SYBR Green I® commercialisé par Roche® sur le Light Cycler 2.0 de Roche®, selon le protocole établi au laboratoire, à savoir une phase de dénaturation à 95°C pendant 10 minutes suivie de 40 cycles de PCR de 30 secondes chacun (10 secondes à 95°C pour la dénaturation, 10 secondes à 55°C pour l'hybridation des amorces et 10 secondes à 72°C pour l'élongation) puis une phase de fusion allant de 60°C à 90°C et enfin le refroidissement à

40°C pendant 30 secondes. La présence de témoin nous a permis d'obtenir des quantifications relatives des différents gènes étudiés.

Les gènes étudiés étaient *psm*α1/2 et *psm*α3. Le gène *gyrB* a été utilisé comme gène de référence, permettant de standardiser les résultats. Les amorces spécifiques utilisées provenaient de la littérature ou ont été dessinées par notre équipe et ont été fournies par Eurofins®.

		Séquence	Référence
PSMα1/2	Forward	TATCAAAAGCTTAATCGA	Li M <i>et al</i> , 2010 (59)
	Reverse	CCCCTTCAAATAAGATGT	
PSMα3	Forward	ATGGAATTCGTAGCAAATTATTC	Cette étude
	Reverse	TAGTTGTTACCTAAAAATTTACC	
GyrB	Forward	GGTGGCGACTTTGATCTAGC	Labandeira-Rey M <i>et al</i> , 2007 (16)
	Reverse	TTATACAACGGTGGCTGTGC	

Tableau 2 : Séquences et références des amorces utilisées au cours de l'étude

L'efficacité des amorces a été déterminée, à l'aide du logiciel REST2009® de Quiagen®, à partir d'un extrait d'ADN d'une souche de *S. aureus* de notre étude et de dilutions successives de cet extrait. L'extraction d'ADN a été faite par achromopeptidase à 56°C sur une souche de culture pure de *S. aureus* et l'extrait a été dilué en cascade afin d'obtenir au moins 3 points. Les efficacités calculées ont été prises en compte pour les quantifications relatives et les dilutions nous ont permis de connaître le domaine de linéarité des PCR. Le niveau d'expression des gènes investigués était exprimé en Ct (Cycle threshold), cycle seuil au cours duquel la fluorescence de l'agent intercalant intégré au produit de PCR devient détectable, et les variations relatives de ces gènes ont été calculées par le logiciel REST2009®, utilisant la méthode de calcul du $2^{-\Delta\Delta Ct}$ affinée à l'efficacité de chaque couple d'amorces, et en prenant pour gène de référence, le gène de ménage *gyrB*.

$$\text{ratio} = \frac{(E_{\text{target}})^{\Delta CP_{\text{target}} (\text{MEAN control} - \text{MEAN sample})}}{(E_{\text{ref}})^{\Delta CP_{\text{ref}} (\text{MEAN control} - \text{MEAN sample})}}$$

[Pfaffl MW *et al*. 2002 (109)]

Figure 6 : Equation mathématique utilisée par le modèle REST® (Relative Expression Software Tool)

Calcul du ratio correspondant à la variation relative d'un gène cible par un modèle mathématique faisant intervenir E (l'efficacité de chacun des couples d'amorces), ΔCP target (la différence de Ct du gène cible entre le cas contrôle et le cas testé) et ΔCP ref (la différence de Ct du gène de référence entre le cas contrôle et le cas testé). L'expression de ce gène de référence est non influencée par les conditions testées).

I.5. Dosage des PSM α

Le dosage des PSM α a été réalisé en chromatographie en phase liquide à haute performance (HPLC) couplée à un spectromètre de masse (MS) Agilent®, série 1100. Une colonne en silice C12 de longueur 50 mm, Uptisphere Strategy 100Å 2,2 μ m, commercialisée par Interchim®, a été utilisée pour ces dosages. Le protocole utilisait un gradient d'élution de 42% à 90% d'acétonitrile sur 13 minutes, avec deux phases mobiles nommées arbitrairement phase A et phase B, contenant chacune de l'eau déionisée, de l'acétonitrile et 0,1 % d'acide formique. L'acide formique permettait de favoriser la formation de groupement peptide(M)+H⁺, détectable par le spectromètre de masse et sa forte ionisation lui permettait d'être facilement volatilisable. L'utilisation d'un gradient d'acétonitrile répondait à la problématique liée au caractère fortement amphiphile des PSM α . Le système d'ionisation était un électrospray ou électronébuliseur en mode positif, qui disperse les liquides en les chargeant positivement. Ceci a permis la reconnaissance des molécules recherchées en fonction de leur m/z (masse / charge). Les différents paramètres de la masse ont été réglés afin d'obtenir une technique optimale permettant de doser PSM α 1/2 et PSM α 3 au cours de la même injection. Le volume injecté était de 10 μ L par échantillon, le débit dans la colonne était de 0,220 mL/min et la température du four était fixée à 45°C.

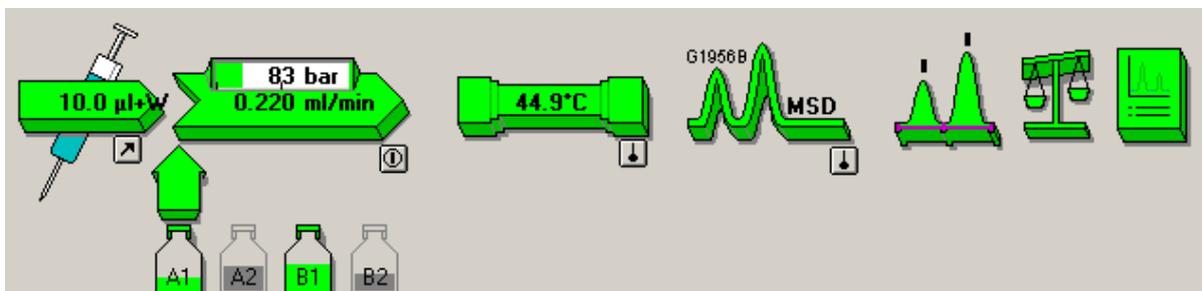


Figure 7 : Schéma du montage de l'HPLC pour la quantification des PSM α

L'injecteur injecte 10,0 μ L d'échantillon. La phase mobile est composée d'un pourcentage variable dans le temps de solution A1 et B1, injectée dans la colonne selon un débit de 0,220 mL/min. Dans ces conditions, la pression de la colonne est stable à 83 bars environ. La température du four où se situe la colonne est fixée à 45°C. Le 4^{ème} élément, MSD, représente le spectromètre de masse et les 3 derniers les logiciels d'interprétation.

La validation de la méthode a été réalisée par dosage d'échantillons contenant de la poudre de PSM α 1/2 et PSM α 3, synthétisée par GeneCust® à partir de la séquence des peptides et formylé en N-terminal. Les échantillons ont été reconstitués dans du BHI-T afin de se rapprocher des échantillons réels et de diminuer la force ionique du peptide par la présence de chlorure de sodium (5 g pour 9 mL). Par ailleurs, des surnageants de culture bactérienne ont été analysés. Ces surnageants de culture bactérienne ont été obtenus après 6 heures, 24 heures et 48 heures de culture de la souche SF8300 et de son mutant délété en PSM α SF8300 Δ *psm-alpha 1-4*, dans les mêmes conditions que décrite précédemment mais sans antibiotique. Ces étapes nous ont permis de connaître les temps de rétention et les masses à rechercher, ainsi que de déterminer le meilleur temps de culture pour permettre l'analyse des PSM α . A partir des échantillons de poudre reconstituée, nous avons réalisé une gamme d'étalonnage afin de pouvoir quantifier les PSM α de nos échantillons.

Chaque échantillon devait subir un traitement spécifique de précipitation à froid dans du méthanol afin de minimiser les risques de contamination et de ne pas boucher la colonne. Cette préparation consistait en une dilution de l'échantillon au 1/5^{ème} dans du méthanol, puis à laisser les déchets éventuels précipiter dans la glace (10 minutes) et à récupérer le surnageant après centrifugation. L'analyse des échantillons de l'étude s'est faite à partir des surnageants obtenus lors des cultures bactériennes décrites précédemment. La quantité de PSM α présente dans le milieu était proportionnelle à l'aire sous la courbe des pics spécifiques retrouvés sur le chromatogramme.

II. Résultats

II.1. CMI

	Imipénème	Oxacilline	Tigécycline	Clindamycine	Linézolide	Vancomycine	Rifampicine	Ofloxacine
Géraldine HT20030749	0,03	0,25	0,25	0,016	0,125	1	0,001	0,195
Géraldine HT20050614	0,03	0,25	0,25	0,016	0,25	1	0,002	0,39
Lyon HT20040012	0,0625	1	1	>125	0,125	1	0,002	12,5
Lyon HT20061175	0,25	2	0,5	>125	0,25	1	0,0005	>12,5
<i>Concentrations critiques (EUCAST 2014 (110))</i>	<i>Pas de seuils</i>	2	0,5	0,25-0,5	4	2	0,06-0,5	1

Tableau 3 : CMI ($\mu\text{g}/\text{mL}$) et concentrations critiques selon l'EUCAST 2014 (110)

Les CMI (Concentrations Minimales Inhibitrices) des 8 antibiotiques testés pour les 4 souches de l'étude sont récapitulées dans le tableau ci-dessus. Au vu de la résistance des souches du clone "Lyon" à la clindamycine et à l'ofloxacine, ces antibiotiques n'ont pas été testés sur ces souches dans notre étude. Pour la tigécycline, le linézolide, la vancomycine et la rifampicine, les souches étaient de phénotype sensible avec des CMI faibles, comme pour la clindamycine et l'ofloxacine sur les souches du clone "Géraldine". Les CMI à l'oxacilline et surtout les CMI à l'imipénème sont paradoxalement faibles sur ces souches de SARM qui en théorie sont résistantes à l'ensemble des β -lactamines. En pratique, ce résultat est fréquent et illustre la difficulté de détecter un SARM par méthode phénotypique. Ces antibiotiques ne sont par ailleurs pas recommandés pour identifier la résistance.

II.2. Efficacités des amorces

Dilutions	Ct (PSM α 1/2)	Ct (PSM α 3)	Ct (GyrB)
1	24,45	26,17	21,88
0,5	25,11	28,06	23,06
0,25	26,12	28,67	
0,125	26,94	29,56	
0,1			25,45
0,0625	27,86	29,71	
Efficacité	1,228	0,902	0,915

Tableau 4 : Efficacités des amorces calculées par le logiciel REST2009®

Les 3 couples d'amorces utilisés pour notre étude, à savoir le couple GyrB, amplifiant le gène de ménage et les 2 couples PSM α amplifiant les gènes *psm α 1/2* et *psm α 3*, ont montré avoir une excellente efficacité, proche de 1. Cette étape, validant l'utilisation de nos amorces, nous a également permis de montrer une perte de linéarité pour des quantités trop faibles d'ADN, c'est-à-dire au-delà de 29 Ct. La dernière dilution au 1/16^{ème} de l'ADN pour le calcul de l'efficacité du couple d'amorce PSM α 3 a été exclue.

II.3. Mise au point de la méthode de dosage des PSM α

Le passage de poudre de PSM α 1/2 et PSM α 3 reconstituées nous ont permis de définir les caractéristiques de ces peptides en HPLC.

	Séquence	Modification	M (Da)	Masses détectées (M+H ⁺ /z)			
				Mono-chargé	Bi-chargé	Tri-chargé	Quadri-chargé
PSM α 1	MGIIAGIHKVIKSLIE QFTGK	Formyl en N-terminal	2287	2288 (hors spectre)	1144,4 (40%)	763,6 (100%)	–
PSM α 3	MEFVAKLFKFFKDL LGKFLGNN	Formyl en N-terminal	2634	2635 (hors spectre)	1318 (80%)	879,3 (100%)	659,6 (70%)

M; Masse Moléculaire, z; charge du peptide, (40%); quantification relative de chaque pics par rapport au plus important qui est à 100%

Tableau 5 : Caractéristiques des PSM α en HPLC-MS, structure et masses détectables

Notre méthode nous a permis de retrouver préférentiellement les peptides triplement chargés, soit les masses 763,7 et 879,2, respectivement pour PSM α 1/2 et PSM α 3. Les temps de rétention spécifiques étaient d'environ 15 minutes pour PSM α 1/2 et 14,5 minutes pour PSM α 3.

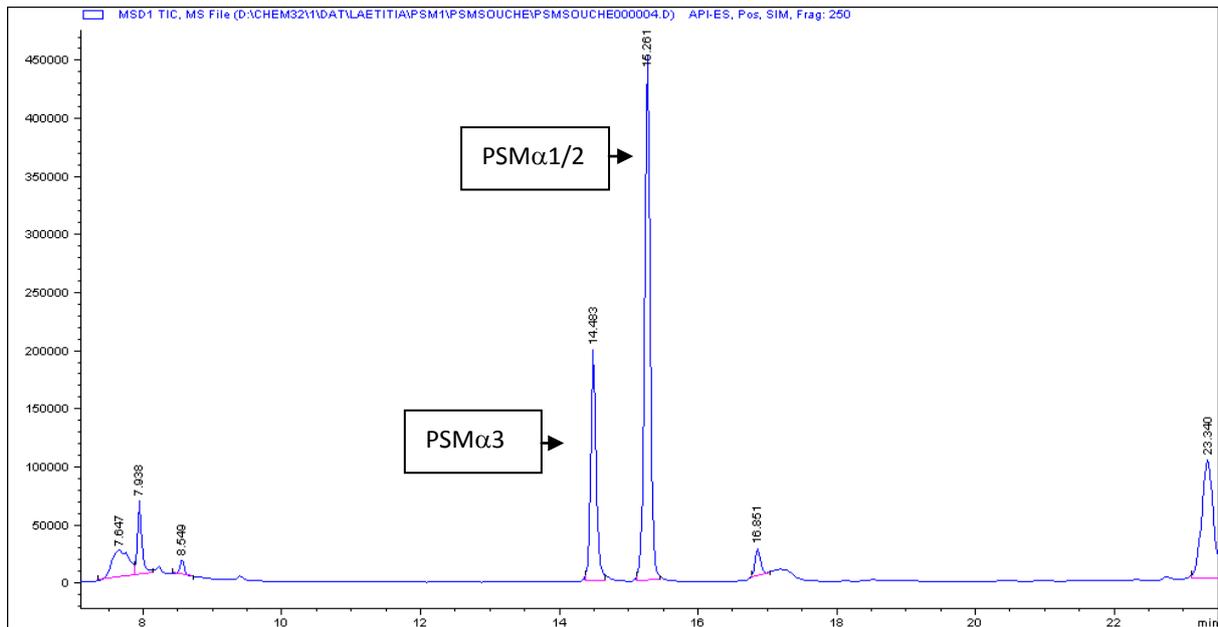


Figure 8 : Chromatogramme type obtenu par HPLC-MS sur un surnageant après 24 heures de culture de la souche SF8300 (clone USA300)

Les études sur les souches de référence nous ont permis de prouver que ces pics caractéristiques correspondaient bien aux PSM α puisque ceux-ci ont disparu lors du passage de l'échantillon obtenu par culture de la souche SF8300 Δ *psm-alpha 1-4*. Les passages d'échantillons après différents temps de culture ont montré une quantité de PSM α bien plus élevée dans le surnageant après 24 heures de culture qu'après 6 heures ou 48 heures de culture. En effet après 24 heures de culture de la souche SF8300, la quantification de PSM α 1 était 22 fois supérieure à la quantité après 6 heures de culture et 12 fois supérieure à la quantité après 48 heures de culture. La quantification de PSM α 3 était 5 fois plus élevée après 24 heures de culture qu'après 6 heures ou 48 heures de culture. Ainsi, nous avons choisi d'analyser nos échantillons après 6 heures et 24 heures de culture bactérienne. De plus, ces dosages répétés plusieurs fois nous ont permis de déterminer le coefficient de variation de la technique, estimé à 9 % pour les dosages de PSM α 1/2 et à 13 % pour celui de PSM α 3.

Les gammes d'étalonnages nous ont permis de définir des zones de dosages allant de 6 ng/mL à 10 μ g/mL pour PSM α 1/2 et de 60 ng/mL à 10 μ g/mL pour PSM α 3. Le passage de ces points de gamme nous a permis également de définir le dosage maximum réalisable qui correspond à une concentration de 150 μ g/mL pour PSM α 1/2 et de 200 μ g/mL pour PSM α 3. Au-delà, le signal est supérieur à 200 000 000, créant une saturation du système de

détection. Le taux minimum détectable a également été recherché et il est de 6 ng/mL, nous permettant de doser les PSMs dans les échantillons dès 35 ng/mL (ceci en tenant compte de la dilution au 1/5^{ème} de l'échantillon dans le méthanol).

La gamme d'étalonnage nous a permis d'évaluer la quantité de PSMs sécrétés par les différentes souches de l'étude :

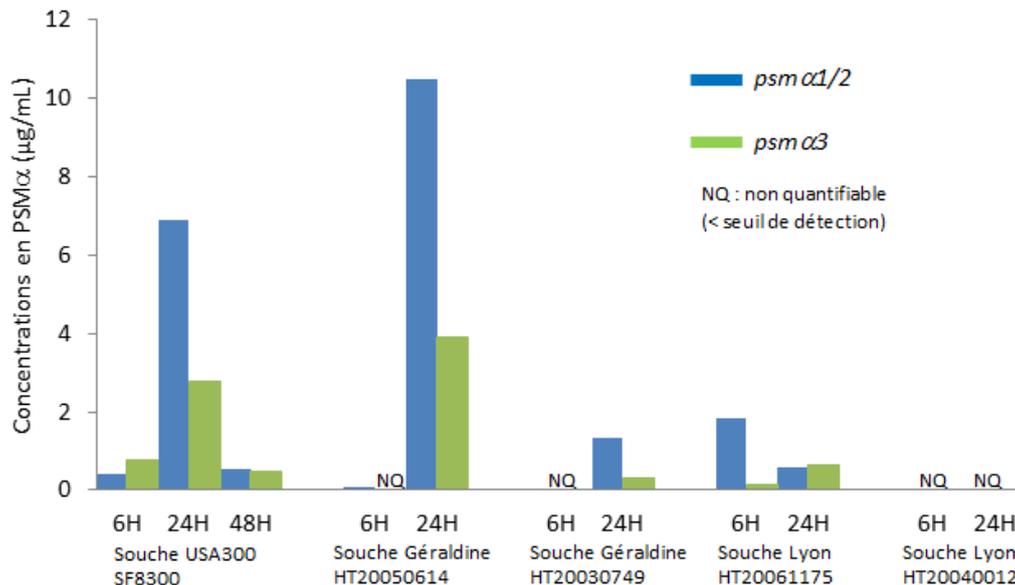


Figure 9 : Quantification des PSMα dans les milieux de culture en fonction des souches

La quantité de PSMα présente dans le milieu de culture varie au cours du temps avec un maximum après 24 heures de culture pour la majorité des souches. En cas de culture prolongée, 48 heures, la concentration de PSMα présente dans le milieu de culture diminue. Le niveau de sécrétion des PSMα semble varier d'une souche à l'autre, même au sein d'un même clone. Par exemple, la souche HT20050614 du clone "Géraldine" sécrète 10 fois plus de PSMα1/2 que la souche HT20030749 du même clone. La concentration dans le surnageant après 24 heures de culture de la souche USA300 était d'environ 7 µg/mL, soit 30% inférieure à celle obtenue avec la souche "Géraldine" HT20050614. Pour certaines souches, notamment la souche du clone Lyon HT20040012, la quantité de PSMs présente dans le milieu de culture était trop faible pour être détectable par notre méthode, soit inférieure à 35 ng/mL.

II.4. Effet des antibiotiques sur la croissance bactérienne

Les mesures de DO (densité optique) et les dénombrements bactériens aux temps 0, 2 heures, 4 heures et 6 heures nous ont permis d'interpréter l'effet des concentrations sub-inhibitrices d'antibiotiques sur la croissance bactérienne. L'effet attendu était un effet nul de l'antibiotique qui à ce niveau de concentration ne doit pas influencer la croissance bactérienne. Cette condition était nécessaire à l'interprétation des résultats de modulation des facteurs de virulence.

Nous avons observé une croissance exponentielle de la bactérie au cours des premières heures, suivie d'un amorçage plus ou moins marqué en fonction des souches et des antibiotiques d'une phase en plateau qui correspond à la fin de la phase de croissance exponentielle :

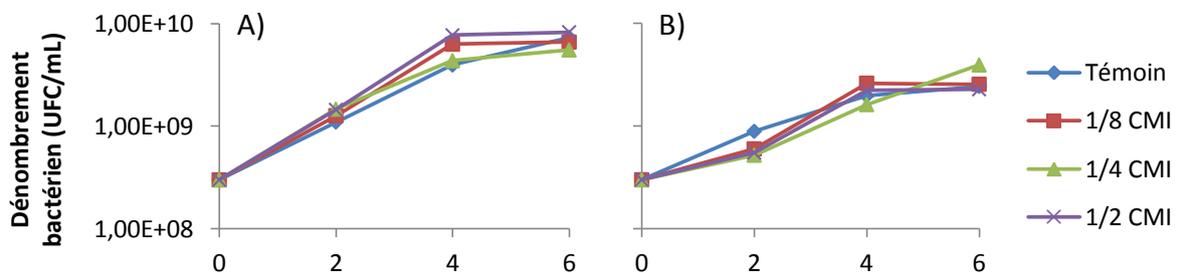


Figure 10 : Croissance bactérienne en fonction du temps sans antibiotique (témoin) ou en présence d'antibiotique à 1/2, 1/4 et 1/8 de la CMI, exemple A) de la souche Lyon HT20040012 en présence d'imipénème et B) de la souche Géraldine HT20050614 en présence de linézolide

Les résultats pour chaque antibiotique, chaque souche et à chaque concentration sont représentés sur les figures en annexe. Pour la majorité des antibiotiques, la croissance bactérienne observée correspondait à celle attendue. Seuls deux antibiotiques ont montré avoir un effet inhibiteur sur la croissance bactérienne.

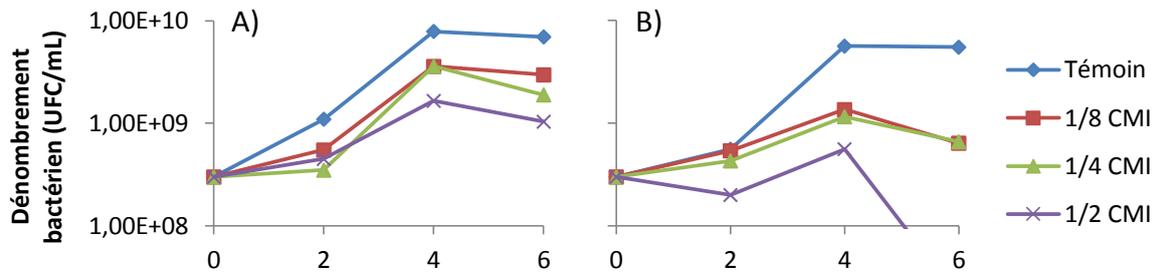


Figure 11 : Croissance bactérienne en fonction du temps sans antibiotique (témoin) ou en présence d'oxacilline à 1/2, 1/4 et 1/8 de la CMI, exemple des souches Lyon A) HT20040012 et B) HT20061175

L'oxacilline à 1/2 de la CMI a diminué la croissance bactérienne sur les 2 souches du clone "Lyon" avec un effet bactéricide important sur la souche HT20061175.

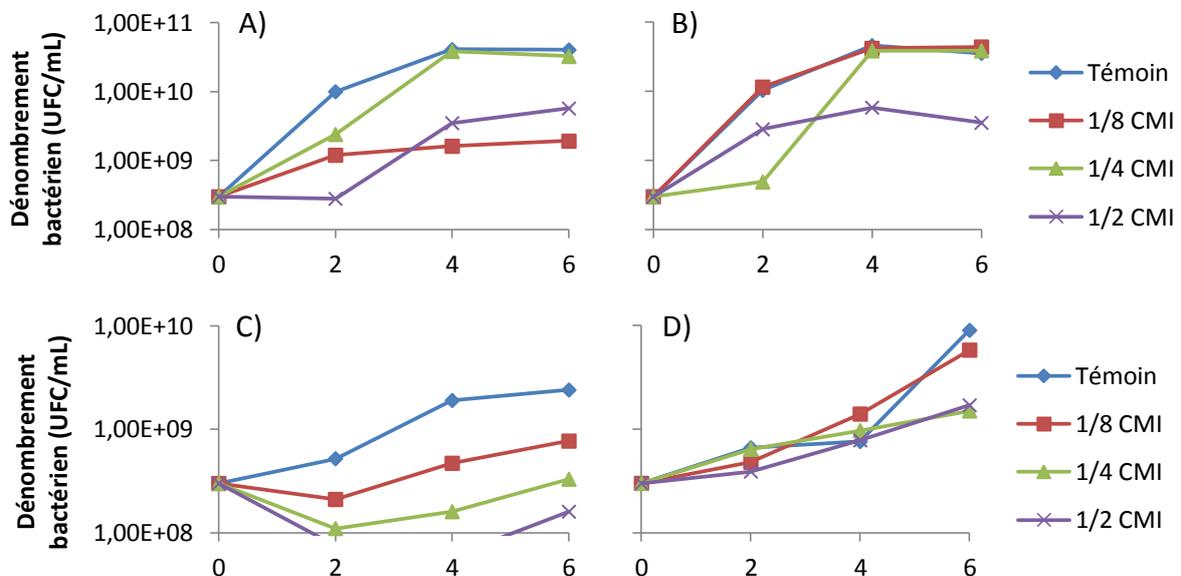


Figure 12 : Croissance bactérienne en fonction du temps sans antibiotique (témoin) ou en présence de tigécycline à 1/2, 1/4 et 1/8 de la CMI, exemple A) de la souche Géraldine HT20030749, B) de la souche Géraldine HT20050614, C) de la souche Lyon HT20040012, et D) de la souche Lyon HT20061175

La tigécycline a également causé un effet négatif sur la croissance bactérienne, qui avait lieu majoritairement au début de la phase exponentielle de croissance de la bactérie avec des dénombrements à 2 heures inférieurs à ceux observés chez les témoins sans antibiotique. Après 6 heures de culture bactérienne, la croissance bactérienne reprenait, même en présence de forte dose de tigécycline, et tendait à se rapprocher des valeurs du témoin sans antibiotique. En moyenne, l'échantillon avec la tigécycline à 1/2 de la CMI est resté 1 log d'UFC/mL en dessous du témoin sans antibiotique. Ces résultats sont à prendre en compte

pour notre interprétation, nous incitant à nuancer chaque conclusion qui tendrait à voir une inhibition des toxines par ces antibiotiques.

II.5. Effet des antibiotiques sur l'expression des gènes *psm* α 1/2 et *psm* α 3

L'effet des antibiotiques sur l'expression des gènes des PSM α a été testé sur les 4 souches de l'étude. Les quantifications des ARNm de PSM α 1/2/GyrB et PSM α 3/GyrB étaient relatives par rapport à un témoin sans antibiotique. Les résultats obtenus sont présentés ci-dessous :

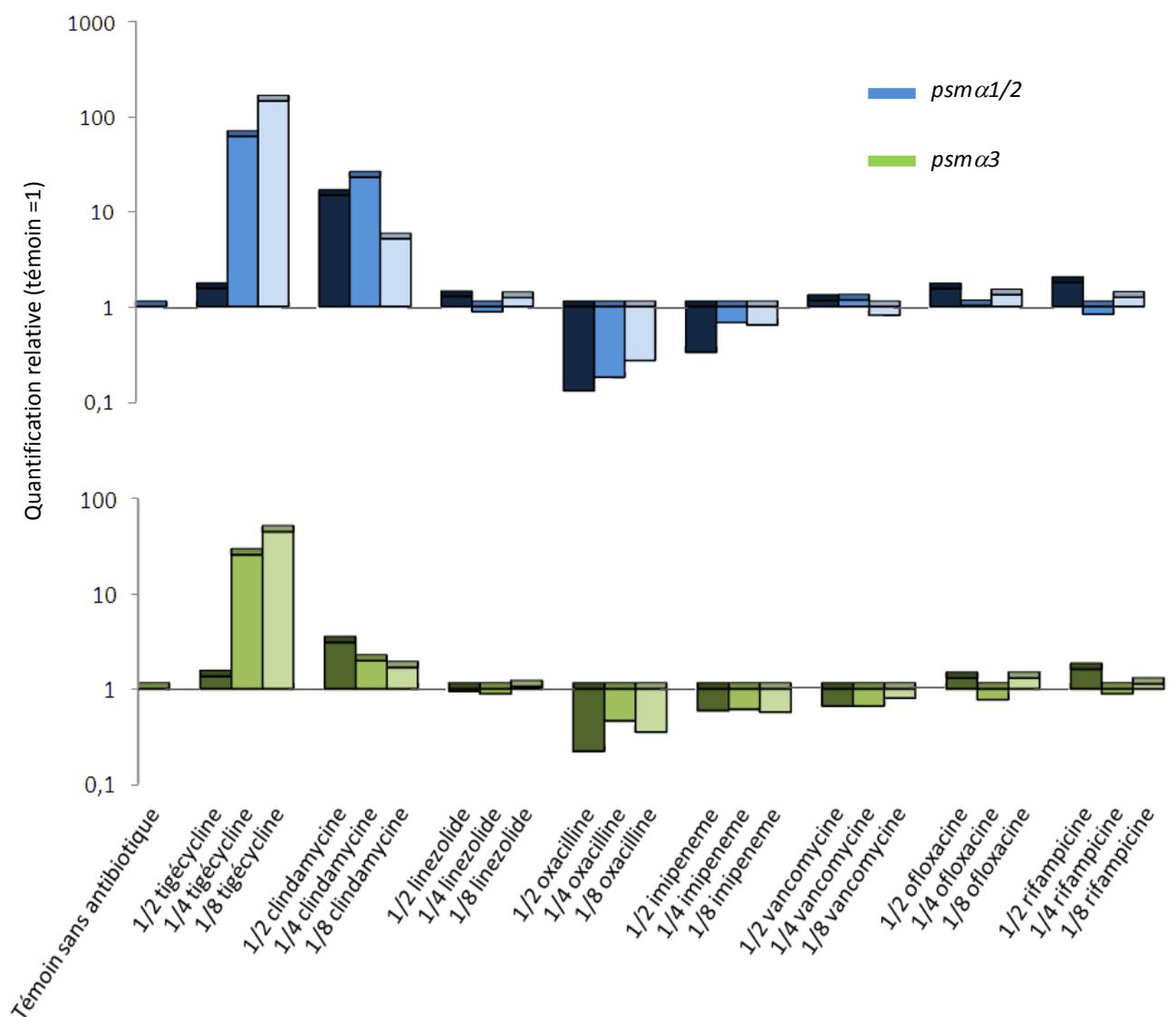


Figure 13 : Souche Géraldine HT20030749 - Quantification relative des variations d'ARNm PSM α 1/2 et PSM α 3 en présence d'antibiotiques à différentes concentrations (1/2, 1/4 et 1/8 de la CMI) par rapport à un témoin sans antibiotique.

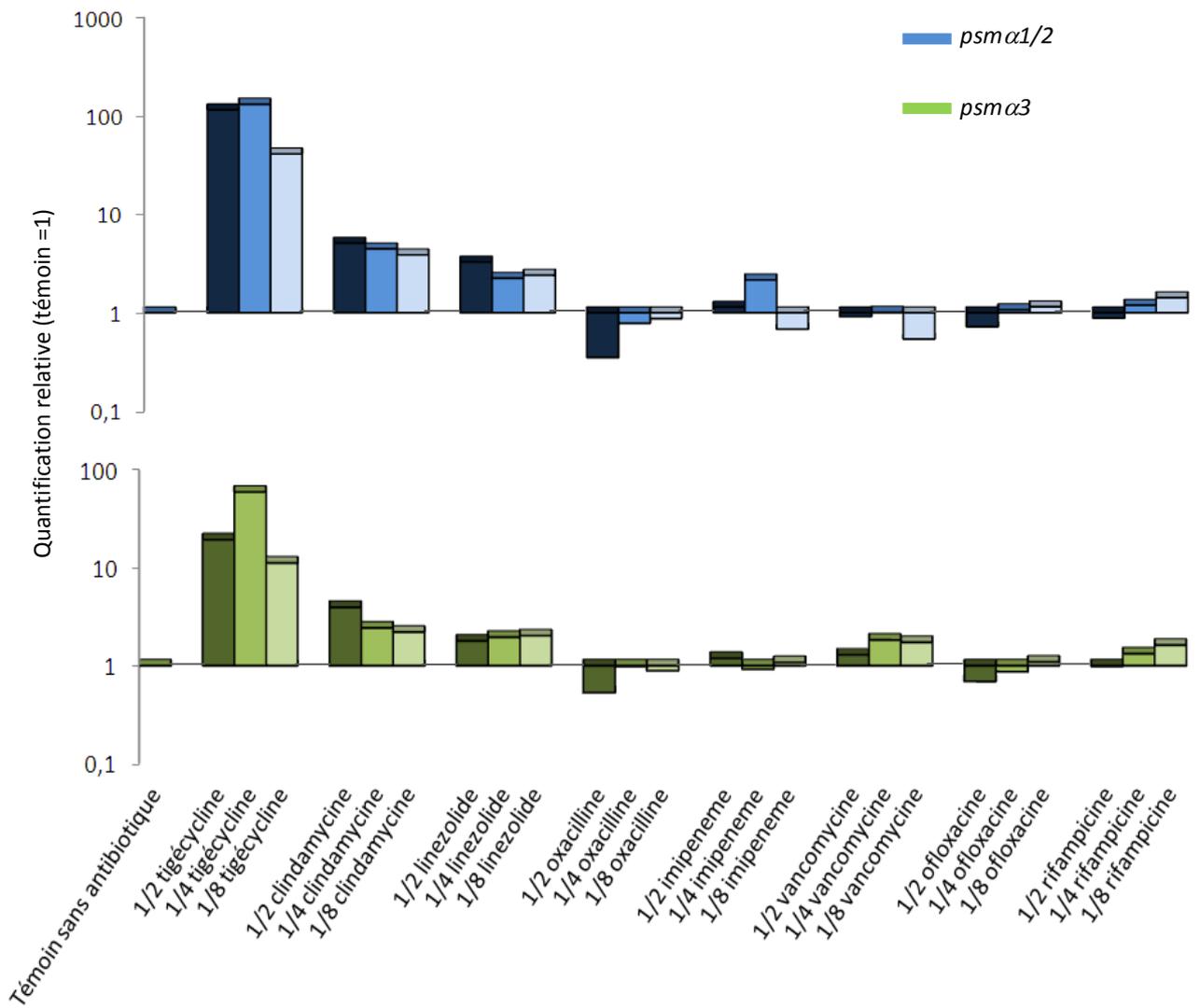


Figure 14 : Souche Géraldine HT20050614 - Quantification relative des variations d'ARNm PSM α 1/2 et PSM α 3 en présence d'antibiotiques à différentes concentrations (1/2, 1/4 et 1/8 de la CMI) par rapport à un témoin sans antibiotique.

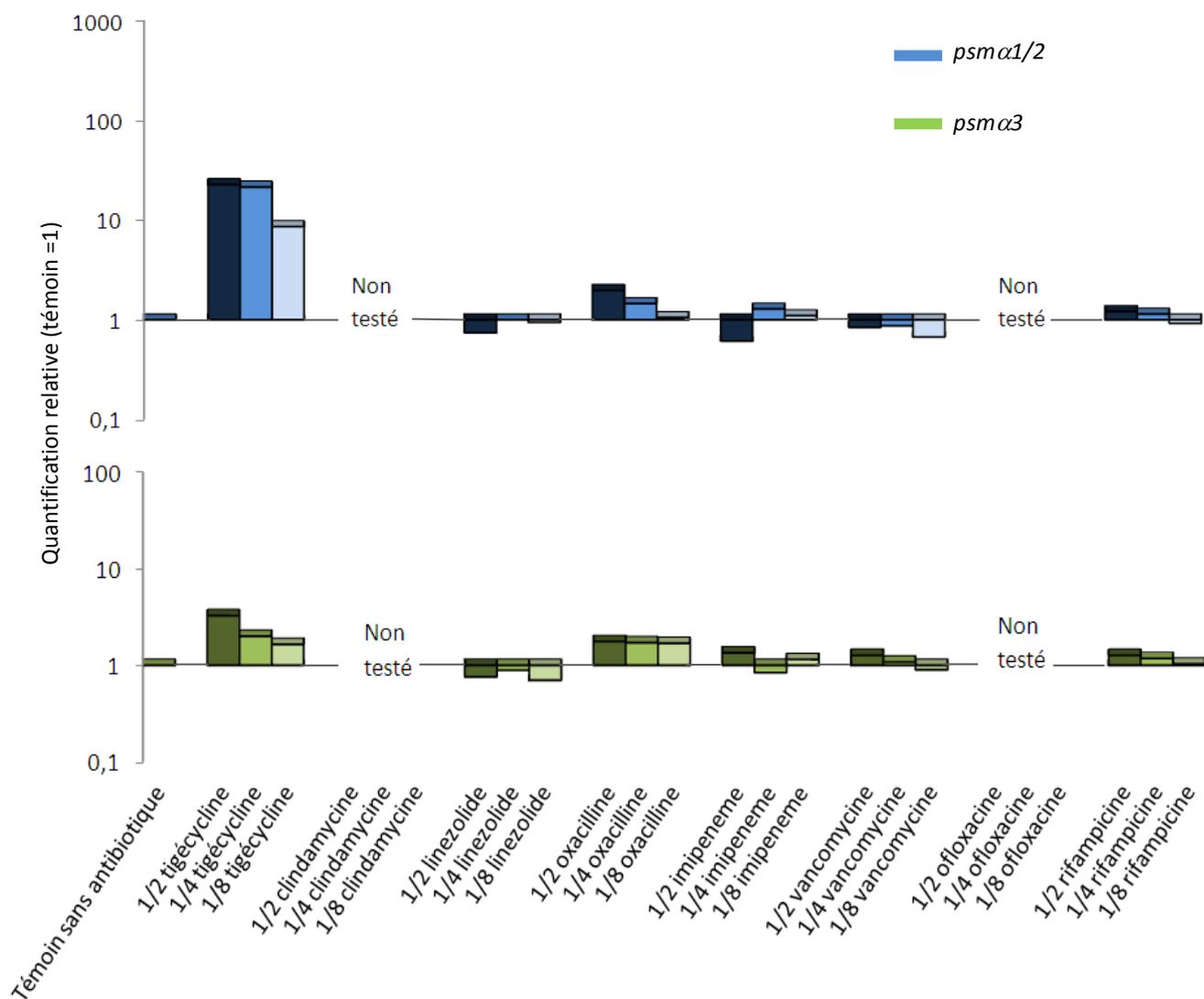


Figure 15 : Souche Lyon HT20040012 - Quantification relative des variations d'ARNm PSM α 1/2 et PSM α 3 en présence d'antibiotiques à différentes concentrations (1/2, 1/4 et 1/8 de la CMI) par rapport à un témoin sans antibiotique.

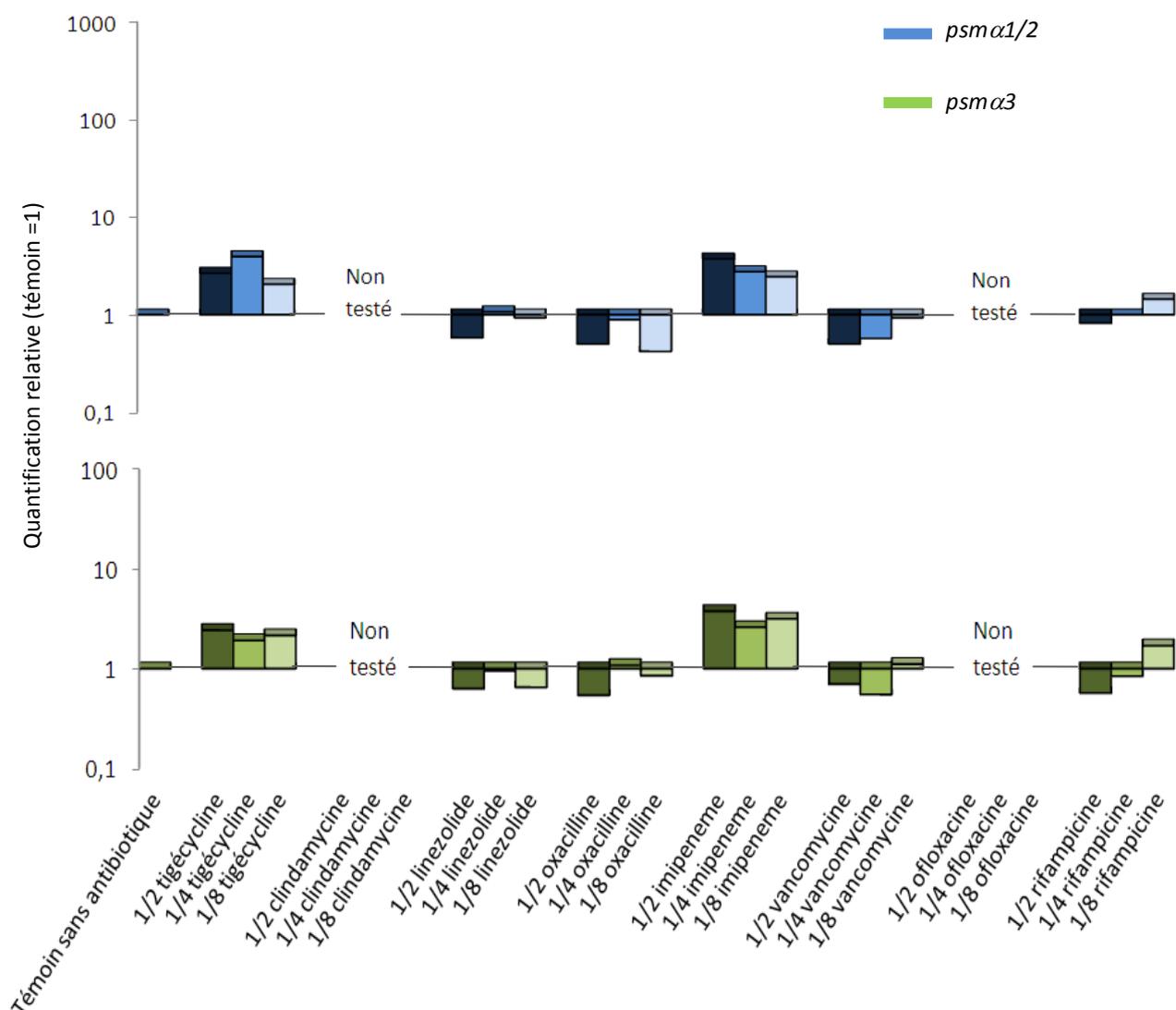


Figure 16 : Souche Lyon HT20061175 - Quantification relative des variations d'ARNm PSMα1/2 et PSMα3 en présence d'antibiotiques à différentes concentrations (1/2, 1/4 et 1/8 de la CMI) par rapport à un témoin sans antibiotique.

Après 6 heures de culture bactérienne en présence de tigécycline, nous avons observé une augmentation très importante de l'ARNm de PSMα1/2. Cette augmentation d'environ 50 fois le témoin pour les souches du clone "Géraldine" et 20 fois le témoin pour les souches du clone "Lyon", a atteint un maximum avec la souche "Géraldine" HT20030749 en présence de tigécycline à 1/8 de la CMI, pour laquelle l'augmentation a été de 150 fois par rapport au témoin sans antibiotique. Le même phénomène d'augmentation en présence de tigécycline a été observé pour l'ARNm PSMα3 avec un maximum à 60 fois le témoin sans antibiotique

pour une souche du clone "Géraldine". Il a été observé une absence de variation de l'ARNm en présence de la tigécycline à 1/2 de la CMI pour la souche "Géraldine" HT20030749. Ce résultat est probablement à relier au défaut de croissance de la bactérie à ce taux d'antibiotique, comme nous l'avons observé au cours de l'analyse des courbes de croissance bactérienne. De la même manière, la souche "Lyon" HT20061175 a présenté une croissance fortement inhibée par la présence de tigécycline et sur cette souche les augmentations d'ARNm étaient moins importantes, allant de 2 à 4 fois le témoin.

La clindamycine a également entraîné une augmentation de l'ARNm avec un maximum de 23 fois le témoin pour PSM α 1/2 en présence de l'antibiotique à 1/4 de la CMI. L'augmentation de l'ARNm PSM α 3 était de 2 à 4 fois supérieure au témoin sans antibiotique. Les souches du clone "Lyon" étant résistantes à la clindamycine, cet antibiotique n'a pas été testé sur celles-ci.

Le linézolide n'a pas entraîné de variation de l'ARNm des PSM α . Cependant sur la souche HT20050614 du clone "Géraldine", il a été observé une augmentation de PSM α 1/2 et de PSM α 3 de 2 à 3 fois le témoin sans antibiotique.

En présence de β -lactamines, oxacilline et imipénème, il n'a pas été observé de variation de l'ARNm des PSM α . Seule la concentration 1/2 de la CMI sur les souches du clone "Géraldine" a causé une diminution de l'ARNm de PSM α 1/2 et dans une moindre mesure de PSM α 3. Cette diminution peut être en lien avec l'inhibition de croissance bactérienne observée en présence de cet antibiotique. Concernant l'imipénème, une augmentation de 3 à 4 fois par rapport au témoin sans antibiotique a été observée sur la souche "Lyon" HT20061175 mais uniquement sur cette souche-là.

Les 3 autres antibiotiques testés, à savoir la vancomycine, l'ofloxacine et la rifampicine n'ont pas montré avoir d'impact sur l'ARNm des PSM α .

II.6. Effet des antibiotiques sur la production des PSM α

L'effet des antibiotiques sur la production des PSM α a été testé sur les 4 souches de l'étude après 6 heures et 24 heures de culture. Les dosages protéiques de PSM α 1/2 et PSM α 3 sur

les surnageants de culture en présence d'antibiotique ont été comparés aux dosages sur les surnageants de culture sans antibiotique. Les résultats obtenus sont présentés ci-dessous :

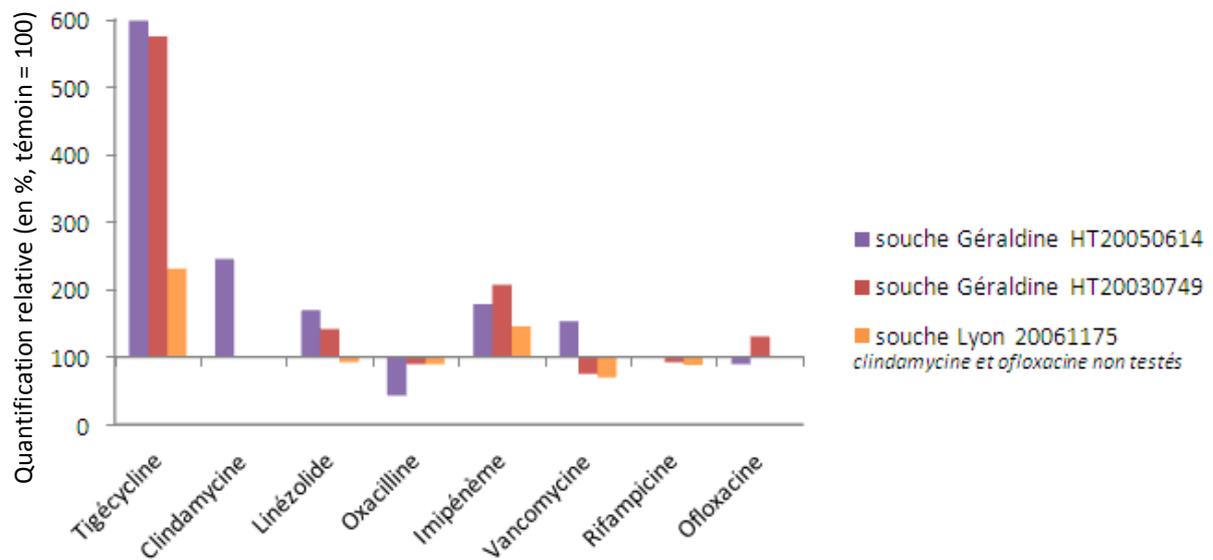


Figure 17 : Quantification relative (en %, témoin = 100) de la quantité de PSM α 1/2 après 6 heures de culture avec différents antibiotiques à 1/4 de la CMI par rapport au témoin sans antibiotique

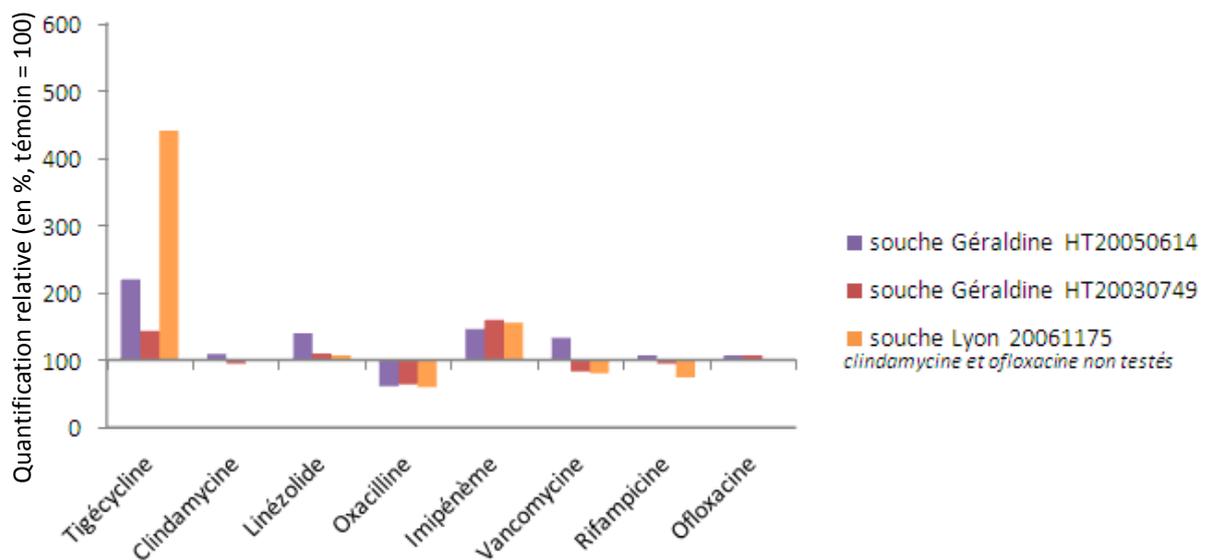


Figure 18 : Quantification relative (en %, témoin = 100) de la quantité de PSM α 3 après 6 heures de culture avec différents antibiotiques à 1/4 de la CMI par rapport au témoin sans antibiotique

L'augmentation observée sur l'ARNm après 6 heures de culture en présence de tigécycline et de clindamycine a été retrouvée sur les dosages protéiques de PSM α . Notamment, la présence de tigécycline dans le milieu de culture a entraîné une augmentation massive de la quantité de PSM α dans les surnageants, avec un maximum de 600 % par rapport au témoin

sans antibiotique pour PSM α 1/2 et de 440 % pour PSM α 3. Pour la clindamycine, l'augmentation était surtout visible sur PSM α 1/2 (augmentation de 245 % par rapport au témoin sans antibiotique). Pour la linézolide, contrairement à l'ARNm qui montrait peu de variations avec cet antibiotique, les dosages protéiques après 6 heures de culture montraient une augmentation allant jusqu'à 170 % du témoin sans antibiotique.

Après 6 heures de culture bactérienne, l'effet des β -lactamines n'était pas homogène. L'oxacilline a entraîné une diminution importante de la quantité de PSM α 1/2 sur une des souches de l'étude (43 % par rapport au témoin sans antibiotique) et pas d'effet sur les autres, alors que l'imipénème a augmenté la quantité de PSM α 1/2 de 145 % à 207 % par rapport au témoin sans antibiotique.

La vancomycine, la rifampicine et l'ofloxacine n'ont pas montré avoir d'impact sur la quantité de PSM α présente dans les surnageants de culture. Un cas isolé d'augmentation de PSM α 1/2 en présence de vancomycine a été retrouvé mais non retenu comme significatif.

Les résultats des variations relatives de PSM α 1/2 et PSM α 3 dans les surnageants après 24 heures de culture en présence d'antibiotique sont présentés ci-dessous :

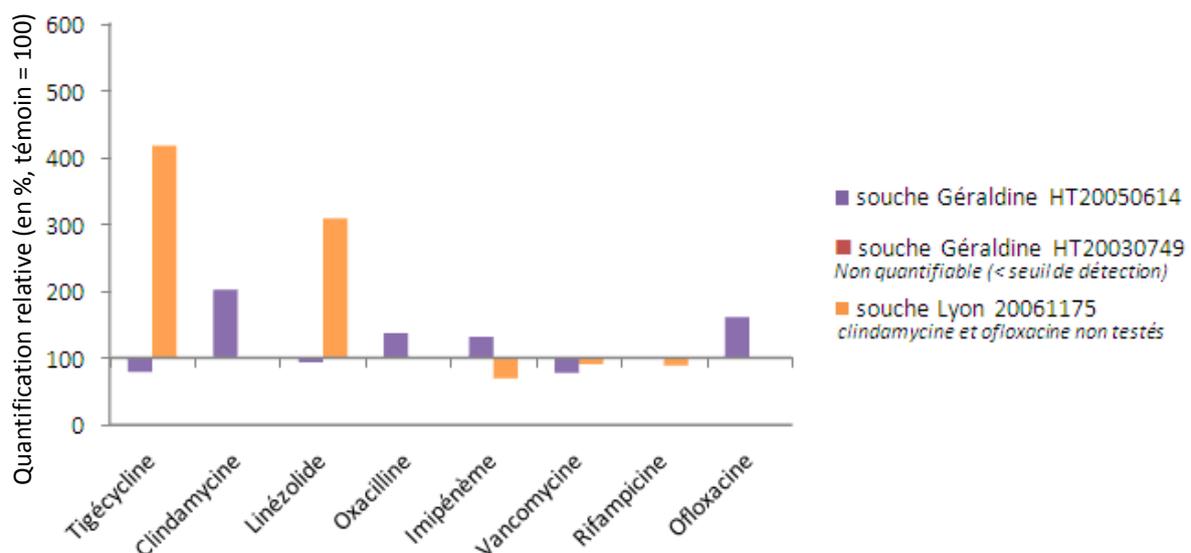


Figure 19 : Quantification relative (en %, témoin = 100) de la quantité de PSM α 1/2 après 24 heures de culture avec différents antibiotiques à 1/4 de la CMI par rapport au témoin sans antibiotique

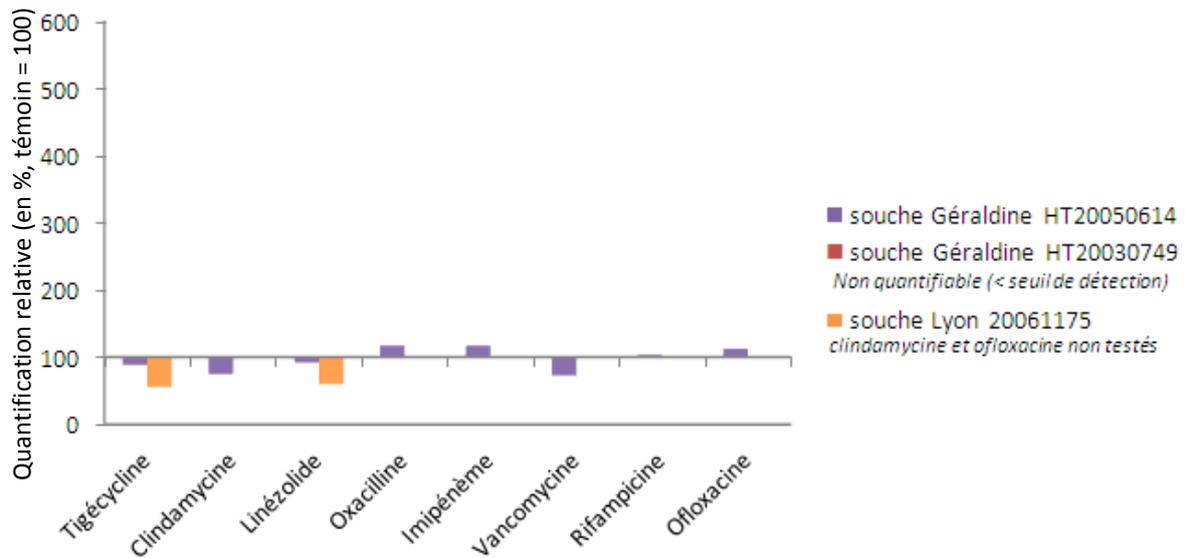


Figure 20 : Quantification relative (en %, témoin = 100) de la quantité de PSM α 3 après 24 heures de culture avec différents antibiotiques à 1/4 de la CMI par rapport au témoin sans antibiotique

Après 24 heures de culture bactérienne, l'augmentation de sécrétion des PSM α par la souche du clone "Géraldine" n'a pas été retrouvée, ni en présence de tigécycline, ni en présence de linézolide. L'augmentation par la clindamycine a été moindre, passant d'une augmentation de 245 % après 6 heures de culture à une augmentation de 200 % par rapport au témoin sans antibiotique après 24 heures. Seule la souche du clone "Lyon" a montré encore des augmentations importantes des dosages protéiques après 24 heures de culture bactérienne.

Contrairement aux résultats obtenus après 6 heures de culture bactérienne, les β -lactamines semblent entraîner une réponse homogène après 24 heures. En effet la présence d'oxacilline et d'imipénème a augmenté respectivement de 131 % et 137 % la quantité de PSM α 1/2 par rapport au témoin sans antibiotique.

La vancomycine, la rifampicine et l'ofloxacine n'ont pas montré avoir d'impact sur la quantité de PSM α présente dans les surnageants de culture.

Discussion

Staphylococcus aureus est un pathogène complexe. A la fois commensale et pathogène, il est responsable d'un nombre important et varié d'infections. La production de facteurs de virulence (protéines de membrane, capsides, toxines, ...) est un élément majeur de la pathogénicité de ce germe. Les PSMs sont de petits peptides récemment découverts (38), présents chez l'ensemble des staphylocoques et qui semblent impliqués dans la virulence de *S. aureus*. En effet, de nombreuses études ont montré la capacité pro-inflammatoire et cytolytique de ces toxines (38, 40, 56). De plus, la variation de leur niveau d'expression, notamment élevé chez les *S. aureus* résistants à la méticilline (SARM) d'origine communautaire, pourrait en partie expliquer la forte virulence de ces souches (40).

L'étude de la modulation de l'expression des facteurs de virulence, notamment la PVL mais également les hémolysines et TSST-1, par les antibiotiques a permis de conclure à des classes d'antibiotiques dits anti-toxiniques. En effet, la clindamycine, le linézolide, la tigécycline et la rifampicine ont montré diminuer l'expression de plusieurs toxines (93, 101, 104, 105). En pratique, ceci se traduit par des recommandations d'utilisation de ces antibiotiques (seul ou en association) pour le traitement des infections sévères à *S. aureus* et surtout en cas de suspicion de pathologie liée aux toxines (choc toxique, pneumonie nécrosante) (97, 98). A l'inverse, d'autres antibiotiques tels que les β -lactamines augmentent l'expression des toxines (95,101).

Concernant l'influence des antibiotiques sur l'expression des PSM α , seules deux études ont été publiées, dans lesquelles les résultats ne correspondent pas à ceux observés pour les autres toxines et sont discordants. En effet l'étude de Joo HS *et al.*, (107) montre une augmentation des PSMs en présence de tétracycline, de clindamycine, de linézolide et une diminution en présence d'oxacilline. L'étude de Yamaki J *et al.*, (108) montre une forte diminution de la quantité de PSM α en présence de TR-700 (antibiotique de la famille du linézolide) et de clindamycine à 1/2 de la concentration minimale inhibitrice (CMI). Sur certaines souches, l'auteur décrit une légère induction par la clindamycine à 1/4 et 1/8 de la CMI. De plus, ces rares études ont été faites sur des souches de *S. aureus* USA300, clone communautaire aux Etats-Unis mais occasionnellement rencontré en France (85).

Dans ce contexte où la place des PSM α dans la virulence de *S. aureus* devient indiscutable, où l'utilisation d'antibiotiques dits anti-toxiques est courante, et où les données de la littérature sont manquantes, nous nous sommes demandés quel serait l'impact d'antibiotiques à concentrations sub-inhibitrices sur l'expression des PSM α chez des SARM appartenant aux clones diffusants en France. Nous avons sélectionné 4 souches de SARM issus de deux fonds génétiques différents et nous avons recherché la modulation de l'expression des PSM α par huit antibiotiques. Pour cela, nous avons étudié deux temps essentiels à la compréhension des mécanismes bactériens. Tout d'abord, nous avons quantifié l'ARNm PSM α et les protéines après 6 heures de culture. Ce temps permettait d'avoir les bactéries en phase exponentielle de croissance, moment où agissent les régulateurs modulant l'expression des ARN messagers. Ensuite, nous avons quantifié les protéines PSM α après 24 heures de culture. Les protéines s'accumulant dans le milieu environnant, ce second temps de culture nous permettait de voir l'effet cumulatif des antibiotiques.

L'utilisation de concentrations sub-inhibitrices d'antibiotiques est nécessaire à notre technique. Au-delà les antibiotiques inhibent la croissance de la bactérie de manière trop importante et les variations d'expression de toxines ne sont plus exploitables puisque en partie dues à la baisse de croissance bactérienne dans le milieu de culture avec antibiotique. Mais ce modèle est également intéressant en clinique car même administrés aux bonnes posologies, les antibiotiques ne sont pas toujours à des concentrations suffisantes dans l'organisme. Ceci dépend de la CMI de l'antibiotique sur le germe, du volume de distribution du patient et de la diffusion du traitement dans les tissus infectés, notamment en cas d'infections ostéo-articulaires ou d'abcès. Connaître l'impact des antibiotiques à concentrations sub-inhibitrices répond à une problématique réelle.

Dans un premier temps, notre étude s'est intéressée aux antibiotiques inhibiteurs de synthèse protéique, à savoir la tigécycline, la clindamycine et la linézolide. Nos résultats ont montré une augmentation majeure de l'expression des PSM α en présence de tigécycline et de clindamycine après 6 heures de culture bactérienne. Cette augmentation a été retrouvée à la fois sur les dosages d'ARNm et sur les dosages protéiques. Comme dans l'étude de Joo HS *et al.*, (107), la concordance entre l'augmentation de l'ARNm et celle du dosage protéique nous laisse supposer une modulation de l'expression des PSM α sous le contrôle

du système *agr*. Les variations de l'ARNIII décrite dans les études semblent confirmer cette hypothèse (107, 108). Par contre, les variations d'ARNIII signent ici l'activation du système *agr* mais ce n'est probablement pas l'effecteur de la transcription des gènes codant pour les PSMs. En effet, les études récentes sur la régulation des PSMs indiquent une régulation de ces peptides *agr*-dépendante mais ARNIII-indépendante. Le régulateur AgrA, impliqué dans la boucle d'amplification du système *agr*, semble être directement responsable de la transcription des gènes codant pour les PSMs par liaison sur les promoteurs des opérons *psm α* et *psm β* (40, 69). D'autres systèmes de régulation pourraient être impliqués, notamment le système SarA qui entraîne une augmentation de la quantité de PSM α présents dans les milieux de culture. Ce régulateur n'agit pas directement sur la transcription des gènes mais diminue la production d'auréolysine, protéase dégradant les PSMs (53, 70). A ce jour, peu d'études sont publiées et le système de régulation exact des PSMs n'est pas élucidé. D'autres régulateurs, notamment les homologues de SarA et surtout le système répresseur Rot (36) ou les régulateurs à deux composants autres que *agr* (*SrrAB* et *SaeRS* qui répondent aux conditions environnementales autres que la densité cellulaire (30, 31)), pourraient être étudiés. Le système Rot nous semble intéressant car il a une action inhibitrice de transcription sur de nombreux gènes et qu'il a déjà été montré qu'une levée de cette inhibition est possible par certains antibiotiques (90). Ces régulateurs agissant à différents moments en fonction des conditions environnementales, nous proposons de les étudier au cours d'une cinétique avec un temps en phase exponentielle de croissance bactérienne, un temps en fin de cette phase et un autre en phase de croissance stationnaire. L'étude de la variation de ces différents gènes pourrait se faire par quantification relative de l'ARNm par qRT-PCR selon le protocole déjà utilisé.

Concernant les dosages protéiques de PSM α effectués après 24 heures de culture bactérienne, ils montrent une augmentation moins importante que celle retrouvée après 6 heures de culture bactérienne (cas de la clindamycine) voir même une neutralisation de l'effet (cas de la tigécycline). Face à cette discordance entre les temps 6 et 24 heures, nous supposons deux actions contraires mais complémentaires liées à ces antibiotiques. Comme décrit précédemment, la tigécycline et la clindamycine augmentent la transcription des gènes codant pour les PSM α mais ils ont aussi une action inhibitrice de synthèse protéique qui entraînent une diminution de la traduction de l'ARNm en protéique. Ces deux actions

semblent s'équilibrer au cours du temps vers une neutralisation de l'induction, voir une diminution de la production de PSM α . Afin de quantifier chacun de ces effets, une étude de l'ARNm PSM α à différents temps, comparé aux dosages protéiques aux même temps, pourrait être intéressante et permettre de valider notre hypothèse.

Dans de rares cas, la tigécycline à 1/2 de la CMI n'entraîne pas de variations de l'expression des PSM α , voir même cause une diminution dès 6 heures de culture. Ces résultats qui pourraient répondre au même phénomène que celui décrit dans l'étude de Yamaki J *et al.* (108) semble surtout être liés à une inhibition de croissance bactérienne.

Le linézolide est également un antibiotique inhibiteur de synthèse protéique mais contrairement à la tigécycline et à la clindamycine, l'augmentation de l'expression des PSM α n'est observée que sur les souches du clone "Géraldine". L'hypothèse d'une sensibilité souche-dépendante pourrait expliquer les résultats de l'équipe de Joo HS *et al.* (107) qui publie une augmentation des PSM α en présence de linézolide sur des souches appartenant au clone USA300. Des études en cours au sein de notre laboratoire sur ce même sujet vont dans ce sens puisque les mêmes dosages réalisés sur des souches de clones USA300 montrent une augmentation importante de l'expression des PSM α en présence de linézolide.

Dans un second temps, nous nous sommes intéressés aux β -lactamines. Souvent décrites comme inductrices de l'expression des toxines (95, 101), leur effet semble être en lien avec le type de liaison aux PLP (95). C'est pourquoi, nous avons choisi deux β -lactamines différentes, l'oxacilline se liant à 3 types de PLP (PLP1, PLP2 et PLP3) et l'imipénème se liant préférentiellement aux PLP1. L'absence de variations de l'ARNm des PSM α en présence de ces deux antibiotiques nous fait supposer une absence d'influence de ces antibiotiques sur l'expression des gènes des PSM α . En revanche, l'augmentation de PSM α 1/2 et PSM α 3 retrouvée après 24 heures de culture nous laisse supposer un mécanisme post-transcriptionnel qui influencerait la concentration en peptides dans le milieu. L'étude de la souche SF8300 après différentes heures de culture nous a permis de constater que les PSM α ne s'accumulaient pas dans le milieu de culture. Elles atteignent une concentration maximum après 24 heures de culture puis la concentration est diminuée après 48 heures de culture. Cette remarque laisse supposer un système sécrété par *S. aureus* de dégradation de

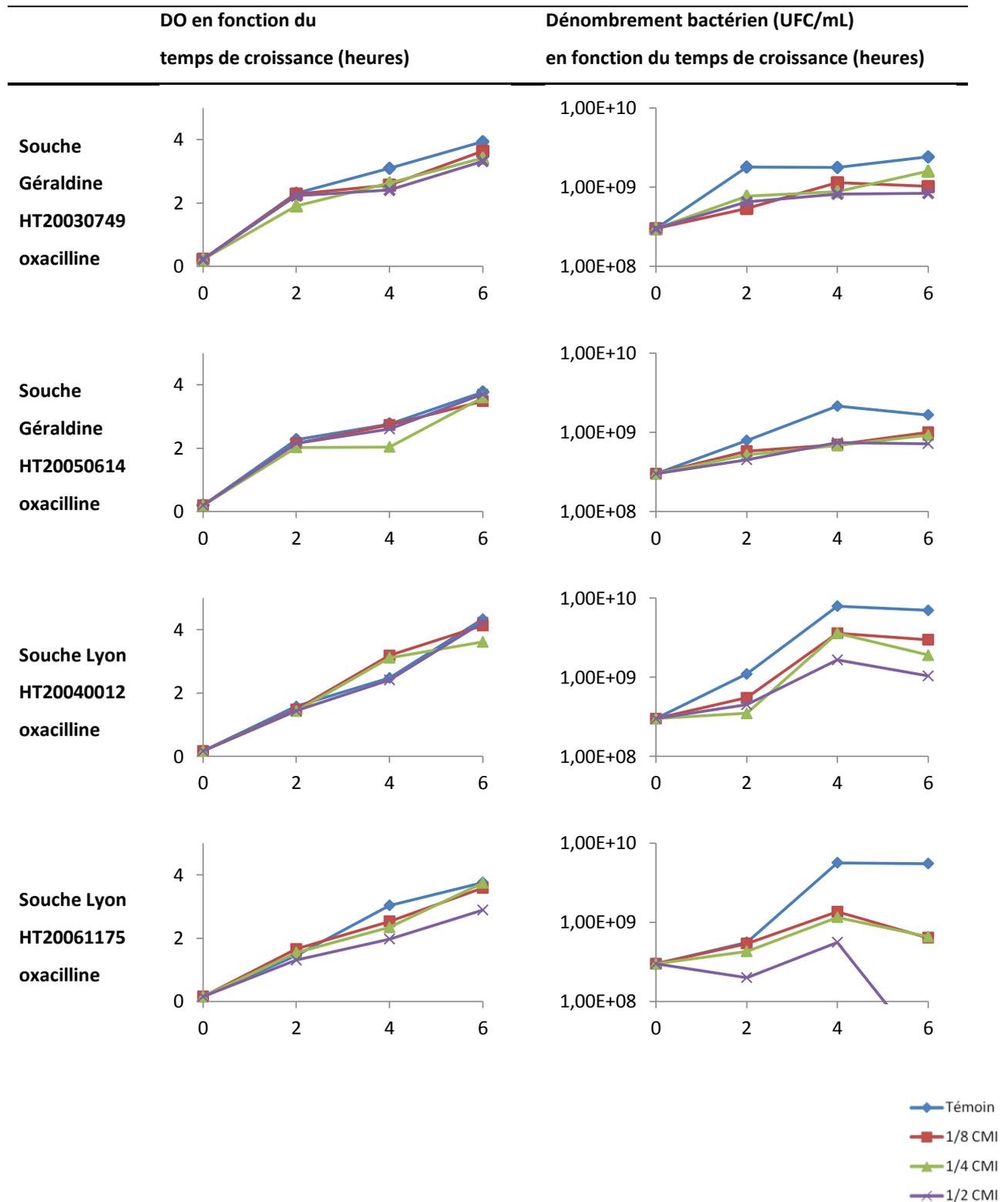
ces peptides. Ce système de protéase pourrait notamment être l'auréolysine (41). L'auréolysine est une protéase dite autolysine de *S. aureus*. Elle est sécrétée par la bactérie elle-même dans le but de renouveler sa paroi. Comme il l'a été montré dans différentes études, en cas d'altération de la paroi, notamment altération par action de β -lactamines, *S. aureus* régule négativement sa production d'autolysine (51, 52). Nous pourrions donc supposer qu'en présence d'oxacilline et d'imipénème, la bactérie diminue sa production d'autolysine et donc diminue la dégradation des PSM α , expliquant ainsi leur accumulation dans le milieu de culture avec ces deux antibiotiques. Afin d'apporter des arguments à notre hypothèse, nous souhaiterions quantifier l'expression génétique de l'auréolysine en présence de β -lactamines, ceci en mesurant l'expression de l'ARNm du gène *aur* par qRT-PCR.

Au final, notre étude montre l'impact des antibiotiques sur la sécrétion des PSM α chez *S. aureus*. Elle montre notamment que les antibiotiques dits anti-toxiques (tigécycline, clindamycine et linézolide) ne le sont pas sur cette toxine. Au contraire, ils ont un effet inducteur qui aurait pu être délétère pour le patient. Mais ils ont également un effet inhibiteur de synthèse protéique qui au final entraîne un effet neutre de ces antibiotiques sur l'expression des PSM α . La place de ces antibiotiques en thérapeutique reste essentielle puisque même si leur effet anti-PSM α n'est pas probant, ils ont toujours un effet anti-toxique face aux leucocidines, hémolysines et autres toxines type TSST-1. Concernant les β -lactamines, même si les mécanismes d'action sont différents, elles augmentent la sécrétion des PSM α et des autres toxines. Leur utilisation en thérapeutique au cours des infections liées aux toxines doit rester en association avec d'autres antibiotiques comme la clindamycine (95). Les études montrent souvent l'importance de l'instauration rapide d'un traitement par linézolide ou clindamycine en cas d'infections liées aux toxines (97, 98). Nos résultats approuvent cette démarche.

Enfin, la réalisation de cette étude nous a permis de mettre au point une technique de dosage des PSM α . Ce dosage réalisé en HPLC-MS est très sensible (seuil de détection à 6 ng/mL) et hautement spécifique. Il nous a permis d'obtenir une quantification relative de PSM α 1/2 et PSM α 3 présents dans nos milieux de culture par rapport à un témoin mais il nous a également permis d'obtenir une quantification absolue de ces peptides grâce à la

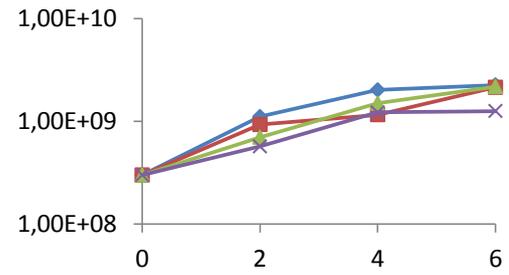
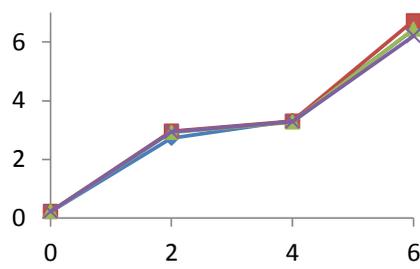
droite d'étalonnage. D'autres études avaient réalisé des dosages similaires et bien que les milieux de culture fussent différents, les concentrations en PSM α étaient proches des nôtres (0,22 à 98 $\mu\text{g}/\text{mL}$ dans l'étude de Yamaki J *et al.* (108), jusqu'à 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ dans l'étude de Wang R *et al.* (40) et 0,03 à 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ dans notre étude). Comme dans l'étude de Yamaki J *et al.*, nous notons que la souche de SARM communautaire USA300 n'est pas la plus fortement sécrétrice de PSM α (108). Dans notre étude, une souche du clone "Géraldine" sécrète 30 % de PSM α supplémentaire. Comme dans l'étude de Wang R *et al.* (40), la quantité de PSM α est non quantifiable, inférieure à notre seuil de détection pour certaines souches de SARM hospitalier. La mise au point de cette technique va nous permettre à l'avenir de rechercher l'effet de potentiels modulateurs de l'expression ou de la sécrétion des PSM α , mais également de doser les PSM α dans différents milieux, notamment dans des prélèvements (pus ou liquides divers) nous permettant ainsi d'évaluer l'impact des PSM α au cours des infections.

Annexe :

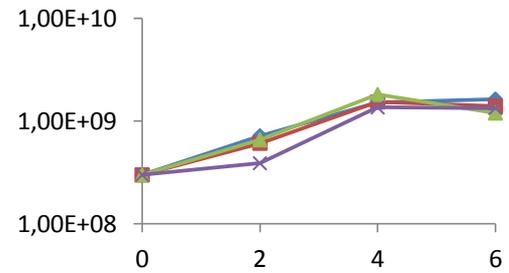
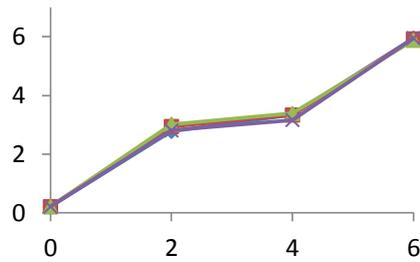


	DO en fonction du temps de croissance (heures)	Dénombrement bactérien (UFC/mL) en fonction du temps de croissance (heures)
--	------------------------------------------------	-----------------------------------------------------------------------------

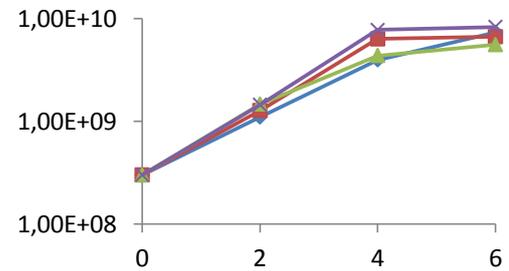
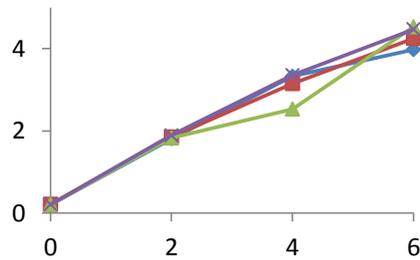
Souche
Géraldine
HT2003749
imipénème



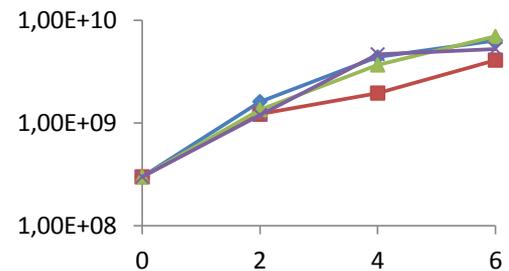
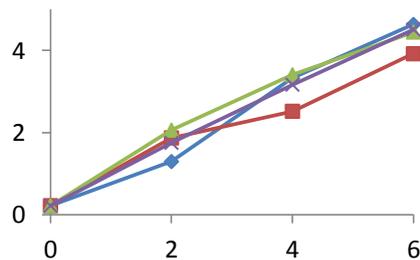
Souche
Géraldine
HT20050614
imipénème



Souche Lyon
HT20040012
imipénème



Souche Lyon
HT20061175
imipénème

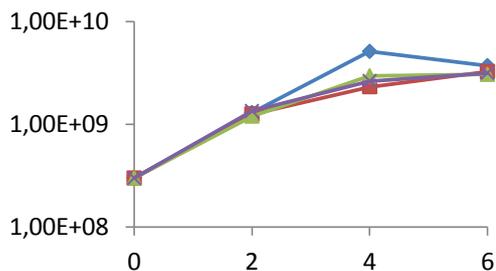
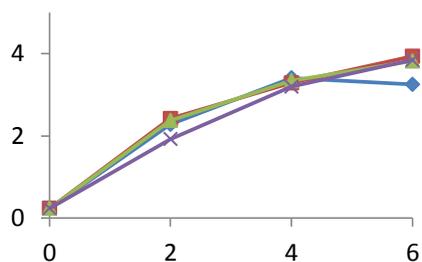


- Témoïn
- 1/8 CMI
- ▲— 1/4 CMI
- ×— 1/2 CMI

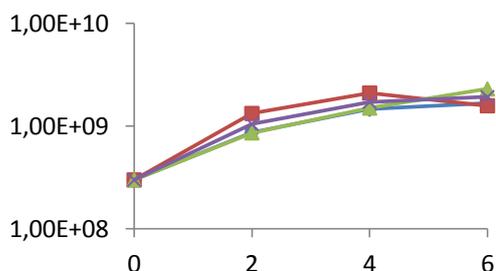
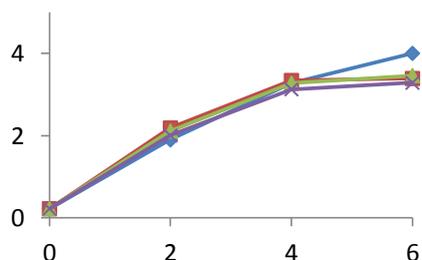
DO en fonction du temps de croissance (heures)

Dénombrement bactérien (UFC/mL) en fonction du temps de croissance (heures)

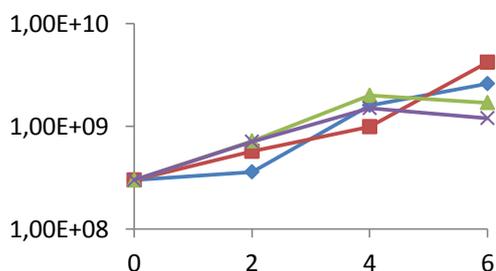
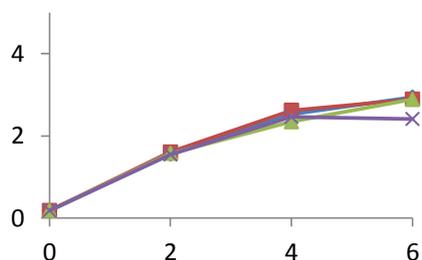
Souche
Géraldine
HT20030749
vancomycine



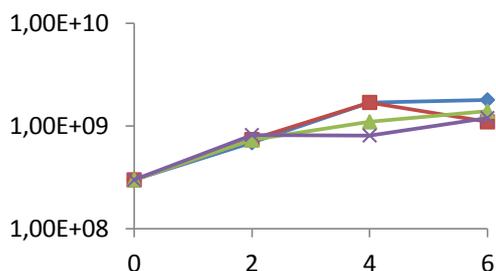
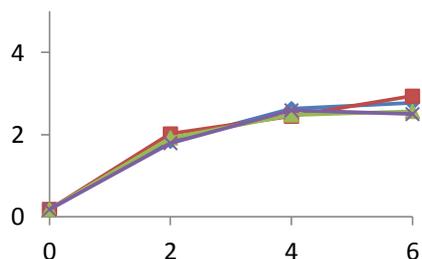
Souche
Géraldine
HT20050614
vancomycine



Souche Lyon
HT20040012
vancomycine



Souche Lyon
HT20061175
vancomycine

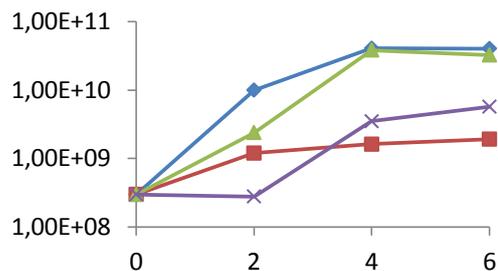
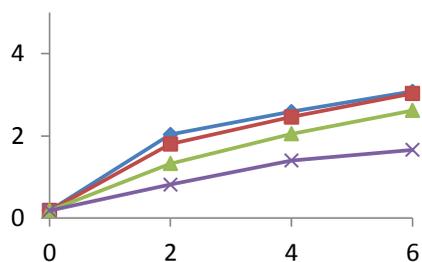


—◆— Témoïn
—■— 1/8 CMI
—▲— 1/4 CMI
—×— 1/2 CMI

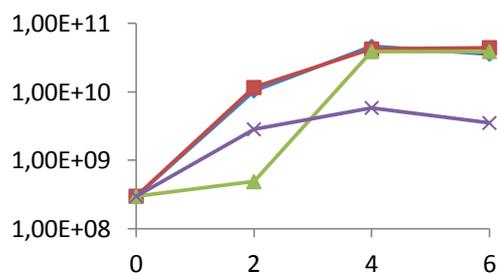
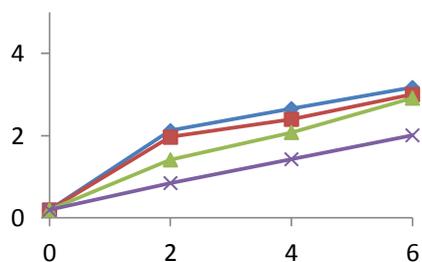
DO en fonction du temps de croissance (heures)

Dénombrement bactérien (UFC/mL) en fonction du temps de croissance (heures)

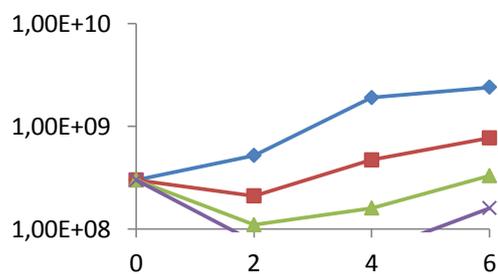
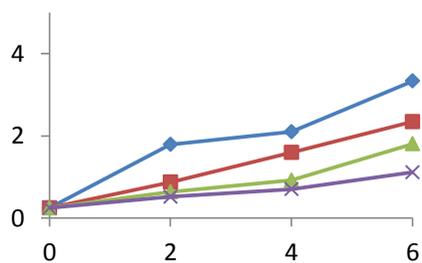
Souche
Géraldine
HT20030749
tigécycline



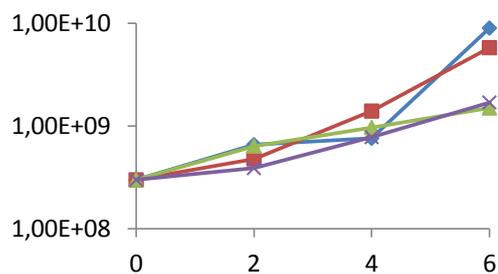
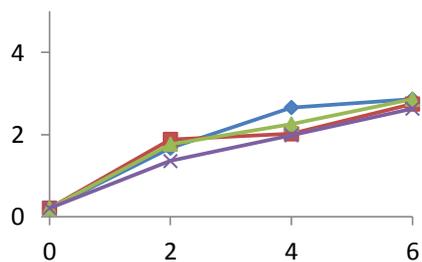
Souche
Géraldine
HT20050614
tigécycline



Souche Lyon
HT20040012
tigécycline



Souche Lyon
HT20061175
tigécycline

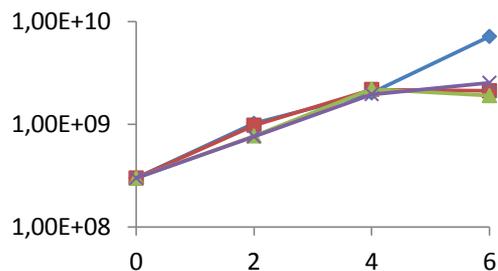
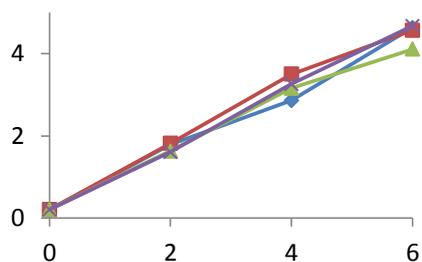


—◆— Témoins
—■— 1/8 CMI
—▲— 1/4 CMI
—×— 1/2 CMI

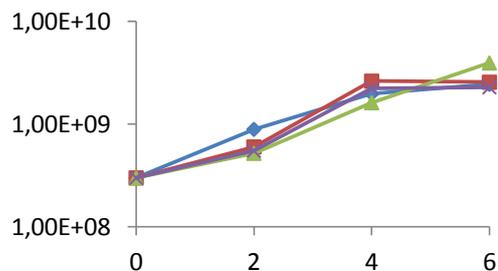
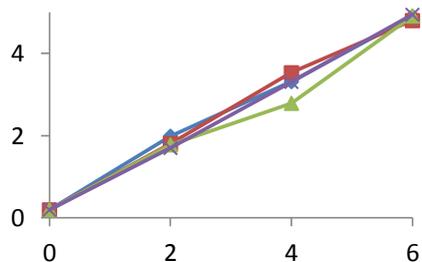
DO en fonction du temps de croissance (heures)

Dénombrement bactérien (UFC/mL) en fonction du temps de croissance (heures)

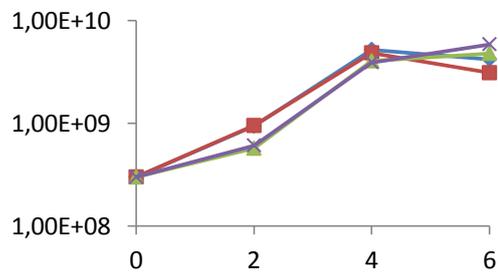
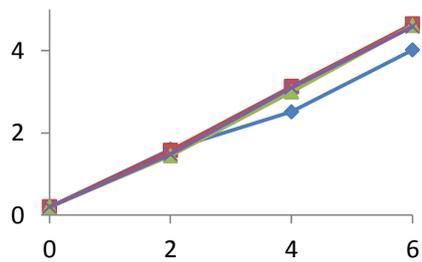
Souche
Géraldine
HT20030749
linézolide



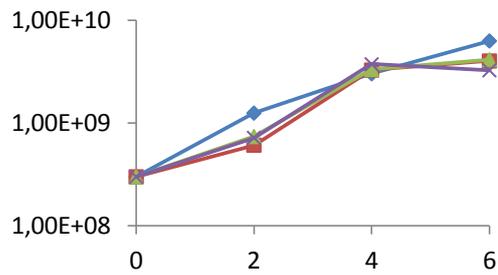
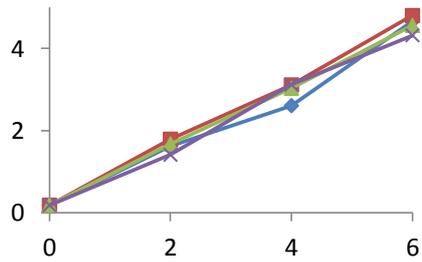
Souche
Géraldine
HT20050614
linézolide



Souche Lyon
HT20040012
linézolide

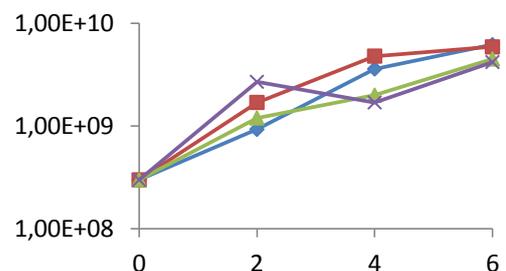
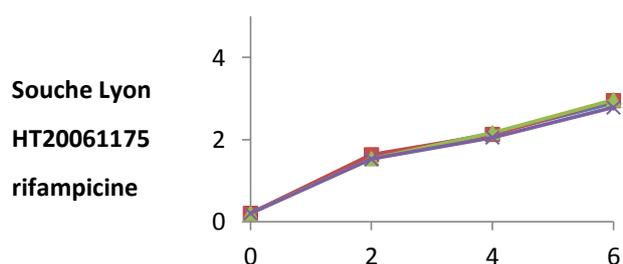
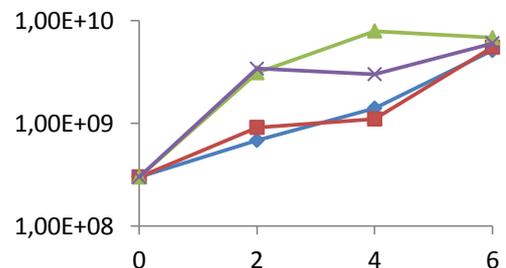
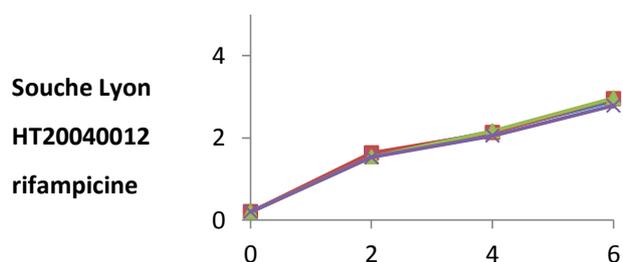
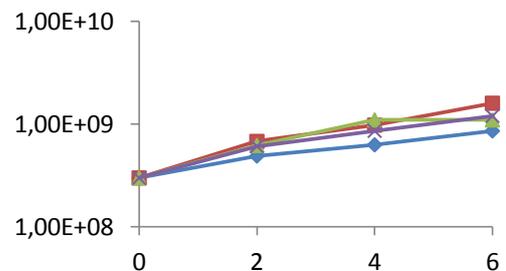
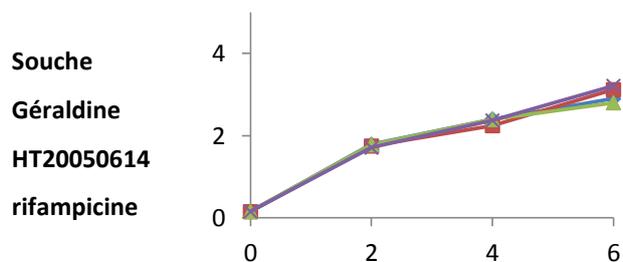
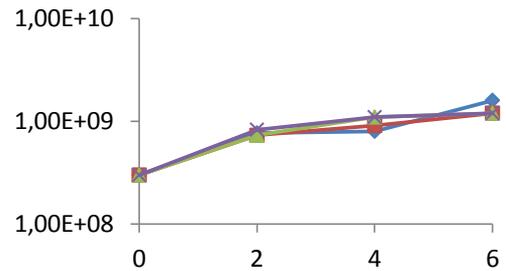
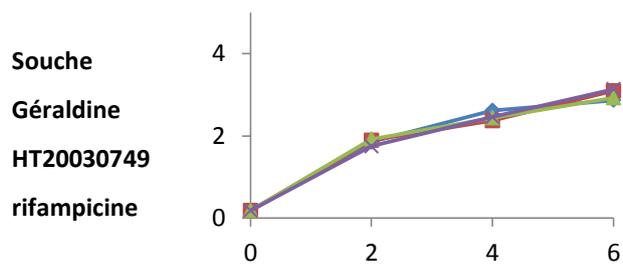


Souche Lyon
HT20061175
linézolide

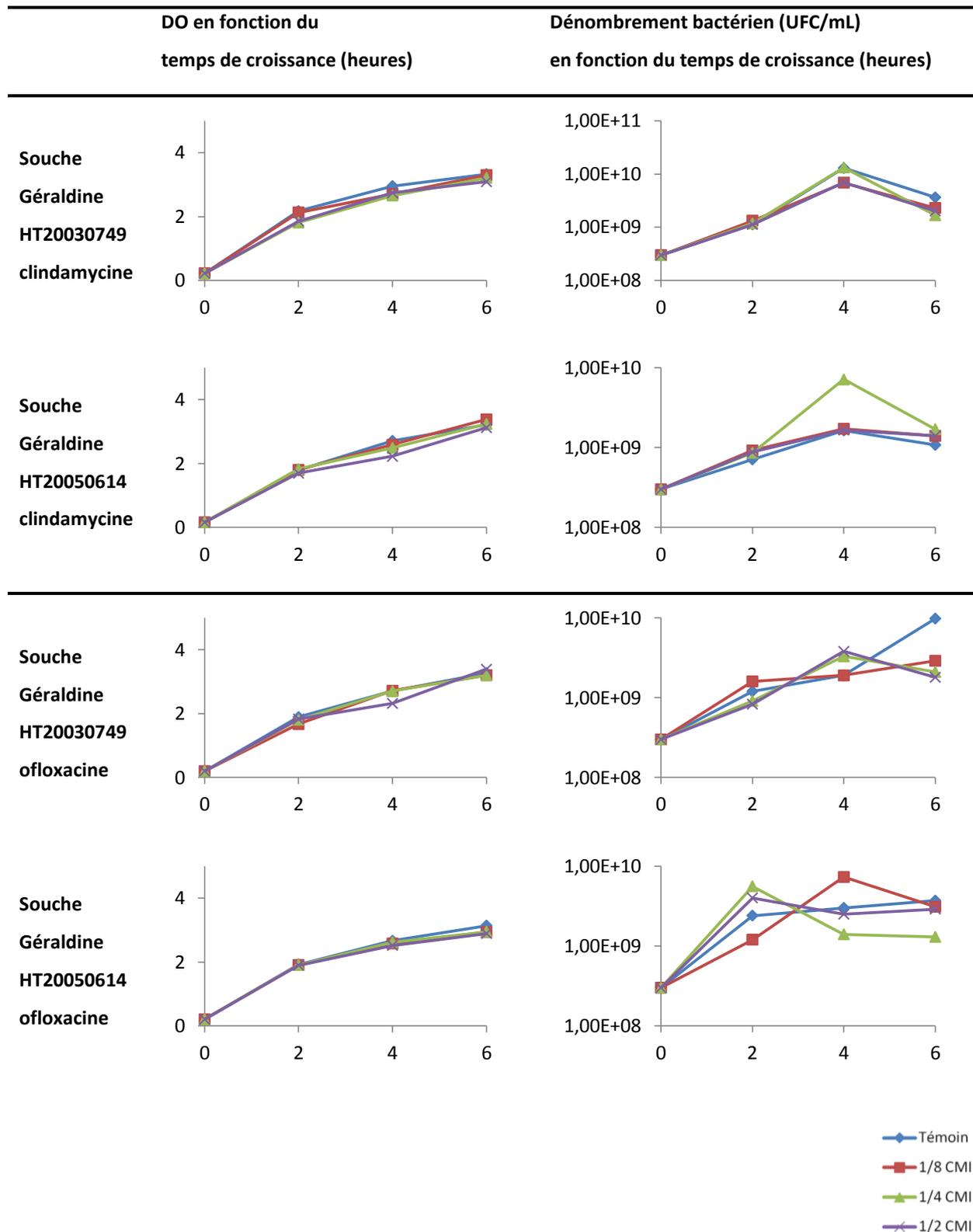


◆ Témoïn
■ 1/8 CMI
▲ 1/4 CMI
× 1/2 CMI

	DO en fonction du temps de croissance (heures)	Dénombrement bactérien (UFC/mL) en fonction du temps de croissance (heures)
--	------------------------------------------------	-----------------------------------------------------------------------------



- ◆ Témoïn
- 1/8 CMI
- ▲ 1/4 CMI
- × 1/2 CMI



Influence des antibiotiques à concentrations sub-inhibitrices (1/2, 1/4 et 1/8 de la CMI) sur la croissance bactérienne par rapport à un témoin sans antibiotique

DO (densité optique) du milieu de culture en fonction du temps et dénombrement bactérien en UFC/mL. La majorité des antibiotiques n'influencent pas sur la croissance bactérienne à concentrations sub-inhibitrices et un profil typique de croissance bactérienne exponentielle suivie d'une phase de plateau est observé.

Conclusions

Conclusions

Staphylococcus aureus est responsable d'un nombre important et varié d'infections. La virulence de ce pathogène repose sur son aptitude à neutraliser le système immunitaire, notamment grâce à sa production de toxines telles que les "Phenol-Solubles Modulines α " (PSM α). Ces peptides, récemment découverts et présents chez l'ensemble des staphylocoques, ont la capacité de moduler le système immunitaire et de détruire les cellules de l'hôte, notamment les polynucléaires neutrophiles, en formant des pores dans les membranes grâce à leur caractère amphiphile. Leur implication dans la pathogénicité de *S. aureus* a été plusieurs fois démontrée, en particulier lorsqu'ils sont fortement sécrétés, ce qui est le cas chez les SARM (*S. aureus* résistant à la méticilline) d'origine communautaire.

Certains antibiotiques anti-staphylococciques sont connus pour moduler l'expression des facteurs de virulence. Dans cette étude, nous nous sommes intéressés à l'impact de concentrations sub-inhibitrices d'antibiotiques (tigécycline, clindamycine, linézolide, oxacilline, imipénème, vancomycine, rifampicine et ofloxacine) sur l'expression des PSM α chez quatre souches de SARM issues de deux fonds génétiques différents.

L'impact de la tigécycline, de la clindamycine et du linézolide sur l'expression des PSM α varie au cours du temps. Lors de la phase exponentielle de croissance bactérienne, une augmentation d'amplitude variable de l'expression des PSM α (ARNm et dosage protéique) a été retrouvée en présence de ces antibiotiques, alors qu'après 24 heures de culture on a observé une diminution des dosages protéiques de PSM α . La hausse initiale de l'ARNm PSM α peut être reliée à un effet des antibiotiques sur le système de régulation global Agr. Néanmoins, ces résultats, à l'opposé des effets de ces antibiotiques sur les autres toxines, suggèrent un mécanisme nouveau, directement sous la régulation d'AgrA et indépendant de l'effecteur ARNIII. La diminution observée dans un second temps sur les dosages protéiques de PSM α semble plus complexe et met en jeu l'inhibition de la synthèse protéique propre à ces antibiotiques.

En présence de β -lactamines, une augmentation globale des PSM α après 24 heures de culture bactérienne a été observée. Les variations d'ARNm PSM α et l'évolution de la quantité de peptides présents dans le milieu laissent supposer une action post-transcriptionnelle. En effet, en réponse à l'action des β -lactamines sur la paroi, la bactérie diminue sa production d'autolysines pour favoriser sa survie. Parmi les autolysines réprimées par les β -lactamines, l'auréolysine est un système de dégradation des PSM α . Ainsi, nous pouvons supposer qu'en présence de β -lactamines, une diminution de cette protéase pourrait limiter la dégradation des PSM α sécrétées et favoriser leur accumulation dans le milieu.

Nos résultats montrent donc un effet modulateur de certains antibiotiques sur l'expression des PSM α et apportent des hypothèses de compréhension à ces actions. La virulence de ces toxines étant reliée à leur niveau d'expression, nos résultats supposent un impact du choix du traitement antibiotique sur l'évolution des infections staphylococciques. Une exploration des systèmes régulateurs tels que le "quorum-sensing" Agr mais également SarA et ses homologues, nécessiterait une étude de la variation de l'expression de ces composants au cours du temps et en présence d'antibiotiques. Ce projet nous apporterait également de précieuses informations sur la régulation globale de l'expression des gènes PSM α . Pour les antibiotiques inhibiteurs de synthèse protéique, l'enjeu thérapeutique se situe dans l'évaluation du temps nécessaire pour que l'équilibre entre les deux mécanismes observés (augmentation transcriptionnelle et diminution traductionnelle) soit en faveur d'un abaissement de virulence.

**Le Président du Jury,
Monsieur le Professeur Jean FRENEY**

**VU ET PERMIS D'IMPRIMER
Lyon, le**

**Vu, la Directrice de l'ISPB – Faculté de Pharmacie de Lyon
Pour le Président de l'Université Claude Bernard**

Madame le Professeur Christine VINCIGUERRA



REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

1. Foster T. *Staphylococcus*. In: Baron S, editor. Medical Microbiology. 4th edition. Galveston (TX): University of Texas Medical Branch at Galveston; 1996. Chapter 12.
2. Lowy FD. *Staphylococcus aureus* infections. N Engl J Med. 1998 Aug 20; 339(8): 520-32.
3. den Heijer CD, van Bijnen EM, Paget WJ, Pringle M, Goossens H, Bruggeman CA, *et al*; APRES Study Team. Prevalence and resistance of commensal *Staphylococcus aureus*, including methicillin-resistant *S. aureus*, in nine European countries: a cross-sectional study. Lancet Infect Dis. 2013 May; 13(5): 409-15.
4. Foster TJ. Immune evasion by staphylococci. Nat Rev Microbiol. 2005 Dec; 3(12): 948-58.
5. Vincenot F, Saleh M, Prévost G. Les facteurs de virulence de *Staphylococcus aureus*. Revue Francophone des Laboratoires. 2008; (407): 61-69.
6. Gordon RJ, Lowy FD. Pathogenesis of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* infection. Clin Infect Dis. 2008 Jun 1; 46.
7. Dinges MM, Orwin PM, Schlievert PM. Exotoxins of *Staphylococcus aureus*. Clin Microbiol Rev. 2000 Jan; 13(1): 16-34.
8. Spaulding AR, Salgado-Pabón W, Kohler PL, Horswill AR, Leung DY, Schlievert PM. Staphylococcal and streptococcal superantigen exotoxins. Clin Microbiol Rev. 2013 Jul; 26(3): 422-47.
9. Xu SX, McCormick JK. Staphylococcal superantigens in colonization and disease. Front Cell Infect Microbiol. 2012 Apr 17; 2: 52.
10. Iwatsuki K, Yamasaki O, Morizane S, Oono T. Staphylococcal cutaneous infections: invasion, evasion and aggression. J Dermatol Sci. 2006 Jun; 42(3): 203-14.
11. Lamand V, Dauwalder O, Tristan A, Casalegno JS, Meugnier H, Bes M, *et al*. Epidemiological data of staphylococcal scalded skin syndrome in France from 1997 to 2007 and microbiological characteristics of *Staphylococcus aureus* associated strains. Clin Microbiol Infect. 2012 Dec; 18(12): E514-21.
12. Bukowski M, Wladyka B, Dubin G. Exfoliative toxins of *Staphylococcus aureus*. Toxins (Basel). 2010 May; 2(5): 1148-65.
13. Ladhani S. Understanding the mechanism of action of the exfoliative toxins of *Staphylococcus aureus*. FEMS Immunol Med Microbiol. 2003 Nov 28; 39(2): 181-9.

14. Jin T, Zhu YL, Li J, Shi J, He XQ, Ding J, *et al.* Staphylococcal protein A, Panton-Valentine leukocidin and coagulase aggravate the bone loss and bone destruction in osteomyelitis. *Cell Physiol Biochem.* 2013; 32(2): 322-33.
15. Diep BA, Chan L, Tattevin P, Kajikawa O, Martin TR, Basuino L, *et al.* Polymorphonuclear leukocytes mediate *Staphylococcus aureus* Panton-Valentine leukocidin-induced lung inflammation and injury. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2010 Mar 23; 107(12): 5587-92.
16. Labandeira-Rey M, Couzon F, Boisset S, Brown EL, Bes M, Benito Y, *et al.* *Staphylococcus aureus* Panton-Valentine leukocidin causes necrotizing pneumonia. *Science.* 2007 Feb 23; 315(5815): 1130-3.
17. Fournier B, Philpott DJ. Recognition of *Staphylococcus aureus* by the innate immune system. *Clin Microbiol Rev.* 2005 Jul; 18(3): 521-40.
18. Foster TJ, Höök M. Surface protein adhesins of *Staphylococcus aureus*. *Trends Microbiol.* 1998 Dec; 6(12): 484-8.
19. Grumann D, Nübel U, Bröker BM. *Staphylococcus aureus* toxins - Their functions and genetics. *Infect Genet Evol.* 2013 Mar 26.
20. Miles G, Jayasinghe L, Bayley H. Assembly of the Bi-component leukocidin pore examined by truncation mutagenesis. *J Biol Chem.* 2006 Jan 27; 281(4): 2205-14.
21. Wilke GA, Bubeck Wardenburg J. Role of a disintegrin and metalloprotease 10 in *Staphylococcus aureus* alpha-hemolysin-mediated cellular injury. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2010 Jul 27; 107(30): 13473-8.
22. Vandenesch F, Lina G, Henry T. *Staphylococcus aureus* hemolysins, bi-component leukocidins, and cytolytic peptides: a redundant arsenal of membrane-damaging virulence factors? *Front Cell Infect Microbiol.* 2012; 2: 12.
23. Schmitz FJ, Veldkamp KE, Van Kessel KP, Verhoef J, Van Strijp JA. Delta-toxin from *Staphylococcus aureus* as a costimulator of human neutrophil oxidative burst. *J Infect Dis.* 1997 Dec; 176(6): 1531-7.
24. Queck SY, Khan BA, Wang R, Bach TH, Kretschmer D, Chen L, *et al.* Mobile genetic element-encoded cytolysin connects virulence to methicillin resistance in MRSA. *PLoS Pathog.* 2009 Jul; 5(7): e1000533.
25. Panton PN, Valentine FCO. Staphylococcal toxin. *Lancet.* 1932; 222: 506-8.
26. Lina G, Bohach GA, Nair SP, Hiramatsu K, Jouvin-Marche E, Mariuzza R; International Nomenclature Committee for Staphylococcal Superantigens. Standard nomenclature for the superantigens expressed by *Staphylococcus*. *J Infect Dis.* 2004 Jun 15; 189(12): 2334-6.

27. Novick RP. Autoinduction and signal transduction in the regulation of staphylococcal virulence. *Mol Microbiol.* 2003 Jun; 48(6): 1429-49.
28. Yarwood JM, Schlievert PM. Quorum sensing in *Staphylococcus* infections. *J Clin Invest.* 2003 Dec; 112(11): 1620-5.
29. Novick RP, Ross HF, Projan SJ, Kornblum J, Kreiswirth B, Moghazeh S. Synthesis of staphylococcal virulence factors is controlled by a regulatory RNA molecule. *EMBO J.* 1993 Oct; 12(10): 3967-75.
30. Liang X, Yu C, Sun J, Liu H, Landwehr C, Holmes D, *et al.* Inactivation of a two-component signal transduction system, SaeRS, eliminates adherence and attenuates virulence of *Staphylococcus aureus*. *Infect Immun.* 2006 Aug; 74(8): 4655-65.
31. Yarwood JM, McCormick JK, Schlievert PM. Identification of a novel two-component regulatory system that acts in global regulation of virulence factors of *Staphylococcus aureus*. *J Bacteriol.* 2001 Feb; 183(4): 1113-23.
32. Cheung AL, Projan SJ. Cloning and sequencing of sarA of *Staphylococcus aureus*, a gene required for the expression of agr. *J Bacteriol.* 1994 Jul; 176(13): 4168-72.
33. Reyes D, Andrey DO, Monod A, Kelley WL, Zhang G, Cheung AL. Coordinated regulation by AgrA, SarA, and SarR to control agr expression in *Staphylococcus aureus*. *J Bacteriol.* 2011 Nov; 193(21): 6020-31.
34. Cheung AL, Schmidt K, Bateman B, Manna AC. SarS, a SarA homolog repressible by agr, is an activator of protein A synthesis in *Staphylococcus aureus*. *Infect Immun.* 2001 Apr; 69(4): 2448-55.
35. Schmidt KA, Manna AC, Gill S, Cheung AL. SarT, a repressor of alpha-hemolysin in *Staphylococcus aureus*. *Infect Immun.* 2001 Aug; 69(8): 4749-58.
36. Saïd-Salim B, Dunman PM, McAleese FM, Macapagal D, Murphy E, McNamara PJ, *et al.* Global regulation of *Staphylococcus aureus* genes by Rot. *J Bacteriol.* 2003 Jan; 185(2): 610-9.
37. Kato F, Kadomoto N, Iwamoto Y, Bunai K, Komatsuzawa H, Sugai M. Regulatory mechanism for exfoliative toxin production in *Staphylococcus aureus*. *Infect Immun.* 2011 Apr; 79(4): 1660-70.
38. Mehlin C, Headley CM, Klebanoff SJ. An inflammatory polypeptide complex from *Staphylococcus epidermidis*: isolation and characterization. *J Exp Med.* 1999 Mar 15; 189(6): 907-18.

39. Otto M, O'Mahoney DS, Guina T, Klebanoff SJ. Activity of *Staphylococcus epidermidis* phenol-soluble modulins expressed in *Staphylococcus carnosus*. J Infect Dis. 2004 Aug 15; 190(4): 748-55.
40. Wang R, Braughton KR, Kretschmer D, Bach TH, Queck SY, Li M, *et al.* Identification of novel cytolytic peptides as key virulence determinants for community-associated MRSA. Nat Med. 2007 Dec; 13(12): 1510-4.
41. Rautenberg M, Joo HS, Otto M, Peschel A. Neutrophil responses to staphylococcal pathogens and commensals via the formyl peptide receptor 2 relates to phenol-soluble modulin release and virulence. FASEB J. 2011 Apr; 25(4): 1254-63.
42. Schwartz K, Syed AK, Stephenson RE, Rickard AH, Boles BR. Functional amyloids composed of phenol soluble modulins stabilize *Staphylococcus aureus* biofilms. PLoS Pathog. 2012; 8(6): e1002744.
43. Cogen AL, Yamasaki K, Sanchez KM, Dorschner RA, Lai Y, MacLeod DT, *et al.* Selective antimicrobial action is provided by phenol-soluble modulins derived from *Staphylococcus epidermidis*, a normal resident of the skin. J Invest Dermatol. 2010 Jan; 130(1): 192-200.
44. Chatterjee SS, Joo HS, Duong AC, Dieringer TD, Tan VY, Song Y, *et al.* Essential *Staphylococcus aureus* toxin export system. Nat Med. 2013 Mar; 19(3): 364-7.
45. Monecke S, Engelmann I, Archambault M, Coleman DC, Coombs GW, Cortez de Jäckel S, *et al.* Distribution of SCCmec-associated phenol-soluble modulin in staphylococci. Mol Cell Probes. 2012 Apr; 26(2): 99-103.
46. Chatterjee SS, Chen L, Joo HS, Cheung GY, Kreiswirth BN, Otto M. Distribution and regulation of the mobile genetic element-encoded phenol-soluble modulin PSM-mec in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. PLoS One. 2011; 6(12): e28781.
47. Gonzalez DJ, Okumura CY, Hollands A, Kersten R, Akong-Moore K, Pence MA, *et al.* Novel phenol-soluble modulin derivatives in community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* identified through imaging mass spectrometry. J Biol Chem. 2012 Apr 20; 287(17): 13889-98.
48. Joo HS, Cheung GY, Otto M. Antimicrobial activity of community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* is caused by phenol-soluble modulin derivatives. J Biol Chem. 2011 Mar 18; 286(11): 8933-40.
49. Sabat AJ, Wladyka B, Kosowska-Shick K, Grundmann H, van Dijk JM, Kowal J, *et al.* Polymorphism, genetic exchange and intragenic recombination of the aureolysin gene among *Staphylococcus aureus* strains. BMC Microbiol. 2008 Jul 29; 8:129.

50. Banbula A, Potempa J, Travis J, Fernandez-Catalán C, Mann K, Huber R, *et al.* Amino-acid sequence and three-dimensional structure of the *Staphylococcus aureus* metalloproteinase at 1.72 Å resolution. *Structure*. 1998 Sep 15; 6(9): 1185-93.
51. Karlsson A, Saravia-Otten P, Tegmark K, Morfeldt E, Arvidson S. Decreased amounts of cell wall-associated protein A and fibronectin-binding proteins in *Staphylococcus aureus* sarA mutants due to up-regulation of extracellular proteases. *Infect Immun*. 2001 Aug; 69(8): 4742-8.
52. Antignac A, Sieradzki K, Tomasz A. Perturbation of cell wall synthesis suppresses autolysis in *Staphylococcus aureus*: evidence for coregulation of cell wall synthetic and hydrolytic enzymes. *J Bacteriol*. 2007 Nov; 189(21): 7573-80.
53. Rasigade JP, Trouillet-Assant S, Ferry T, Diep BA, Sapin A, Lhoste Y, *et al.* PSMs of hypervirulent *Staphylococcus aureus* act as intracellular toxins that kill infected osteoblasts. *PLoS One*. 2013 May 14; 8(5): e63176.
54. Fu H, Karlsson J, Bylund J, Movitz C, Karlsson A, Dahlgren C. Ligand recognition and activation of formyl peptide receptors in neutrophils. *J Leukoc Biol*. 2006 Feb; 79(2): 247-56.
55. Liles WC, Thomsen AR, O'Mahony DS, Klebanoff SJ. Stimulation of human neutrophils and monocytes by staphylococcal phenol-soluble modulins. *J Leukoc Biol*. 2001 Jul; 70(1): 96-102.
56. Cheung GY, Duong AC, Otto M. Direct and synergistic hemolysis caused by *Staphylococcus* phenol-soluble modulins: implications for diagnosis and pathogenesis. *Microbes Infect*. 2012 Apr; 14(4): 380-6.
57. Hongo I, Baba T, Oishi K, Morimoto Y, Ito T, Hiramatsu K. Phenol-soluble modulin alpha 3 enhances the human neutrophil lysis mediated by Pantone-Valentine leukocidin. *J Infect Dis*. 2009 Sep 1; 200(5): 715-23.
58. Cheung GY, Rigby K, Wang R, Queck SY, Braughton KR, Whitney AR, *et al.* *Staphylococcus epidermidis* strategies to avoid killing by human neutrophils. *PLoS Pathog*. 2010 Oct 7; 6(10): e1001133.
59. Li M, Cheung GY, Hu J, Wang D, Joo HS, Deleo FR, *et al.* Comparative analysis of virulence and toxin expression of global community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strains. *J Infect Dis*. 2010 Dec 15; 202(12): 1866-76.
60. Surewaard BG, Nijland R, Spaan AN, Kruijtz JA, de Haas CJ, van Strijp JA. Inactivation of staphylococcal phenol soluble modulins by serum lipoprotein particles. *PLoS Pathog*. 2012; 8(3): e1002606.

61. Grosz M, Kolter J, Paprotka K, Winkler AC, Schäfer D, Chatterjee SS, *et al.* Cytoplasmic replication of *Staphylococcus aureus* upon phagosomal escape triggered by phenol-soluble modulins. *Cell Microbiol.* 2013 Oct 24.
62. Periasamy S, Chatterjee SS, Cheung GY, Otto M. Phenol-soluble modulins in staphylococci: What are they originally for? *Commun Integr Biol.* 2012 May 1; 5(3): 275-7.
63. Wang R, Khan BA, Cheung GY, Bach TH, Jameson-Lee M, Kong KF, *et al.* *Staphylococcus epidermidis* surfactant peptides promote biofilm maturation and dissemination of biofilm-associated infection in mice. *J Clin Invest.* 2011 Jan; 121(1): 238-48.
64. Yao Y, Sturdevant DE, Otto M. Genomewide analysis of gene expression in *Staphylococcus epidermidis* biofilms: insights into the pathophysiology of *S. epidermidis* biofilms and the role of phenol-soluble modulins in formation of biofilms. *J Infect Dis.* 2005 Jan 15; 191(2): 289-98.
65. Forsman H, Christenson K, Bylund J, Dahlgren C. Receptor-dependent and -independent immunomodulatory effects of phenol-soluble modulin peptides from *Staphylococcus aureus* on human neutrophils are abrogated through peptide inactivation by reactive oxygen species. *Infect Immun.* 2012 Jun; 80(6): 1987-95.
66. Kretschmer D, Gleske AK, Rautenberg M, Wang R, Köberle M, Bohn E, *et al.* Human formyl peptide receptor 2 (FPR2/ALX) senses highly pathogenic *Staphylococcus aureus*. *Cell Host Microbe.* 2010 Jun 25; 7(6): 463-73.
67. Vuong C, Dürr M, Carmody AB, Peschel A, Klebanoff SJ, Otto M. Regulated expression of pathogen-associated molecular pattern molecules in *Staphylococcus epidermidis*: quorum-sensing determines pro-inflammatory capacity and production of phenol-soluble modulins. *Cell Microbiol.* 2004 Aug; 6(8): 753-9.
68. Kretschmer D, Nikola N, Dürr M, Otto M, Peschel A. The virulence regulator Agr controls the staphylococcal capacity to activate human neutrophils via the formyl peptide receptor 2. *J Innate Immun.* 2012; 4(2): 201-12.
69. Queck SY, Jameson-Lee M, Villaruz AE, Bach TH, Khan BA, Sturdevant DE, *et al.* RNAIII-independent target gene control by the agr quorum-sensing system: insight into the evolution of virulence regulation in *Staphylococcus aureus*. *Mol Cell.* 2008 Oct 10; 32(1): 150-8.
70. Zielinska AK, Beenken KE, Joo HS, Mrak LN, Griffin LM, Luong TT, *et al.* Defining the strain-dependent impact of the Staphylococcal accessory regulator (sarA) on the alpha-toxin phenotype of *Staphylococcus aureus*. *J Bacteriol.* 2011 Jun; 193(12): 2948-58.

71. Lowy FD. Antimicrobial resistance: the example of *Staphylococcus aureus*. J Clin Invest. 2003 May; 111(9): 1265-73.
72. Jevons MP. "Celbenin"-resistant staphylococci. BMJ. 1961 Jan; 124(1): 124-125.
73. Ito T, Katayama Y, Asada K, Mori N, Tsutsumimoto K, Tiensasitorn C, *et al*. Structural comparison of three types of staphylococcal cassette chromosome *mec* integrated in the chromosome in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. Antimicrob Agents Chemother. 2001 May; 45(5): 1323-36.
74. Hiramatsu K, Cui L, Kuroda M, Ito T. The emergence and evolution of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. Trends Microbiol. 2001 Oct; 9(10): 486-93.
75. Ito T, Okuma K, Ma XX, Yuzawa H, Hiramatsu K. Insights on antibiotic resistance of *Staphylococcus aureus* from its whole genome: genomic island SCC. Drug Resist Updat. 2003 Feb; 6(1): 41-52.
76. David MZ, Daum RS. Community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: epidemiology and clinical consequences of an emerging epidemic. Clin Microbiol Rev. 2010 Jul; 23(3): 616-87.
77. Dauwalder O, Lina G, Durand G, Bes M, Meugnier H, Jarlier V, *et al*. Epidemiology of invasive methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* clones collected in France in 2006 and 2007. J Clin Microbiol. 2008 Oct; 46(10): 3454-8.
78. Lelièvre H, Lina G, Jones ME, Olive C, Forey F, Roussel-Delvallez M, *et al*. Emergence and spread in French hospitals of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* with increasing susceptibility to gentamicin and other antibiotics. J Clin Microbiol. 1999 Nov; 37(11): 3452-7.
79. Margat E, Dargère S, Daurel C, Fines-Guyon M, Michon J, Verdon R, *et al*. Endocardite à *Staphylococcus aureus* communautaire résistant à la méticilline appartenant au clone émergent Géraldine : un diagnostic microbiologique difficile. Med Mal Infect. 2013 Jul; 43(7): 299-301.
80. Robert J, Tristan A, Cavalié L, Decousser JW, Bes M, Etienne J, *et al*; ONERBA (Observatoire National de l'Epidémiologie de Résistance Bactérienne aux Antibiotiques). Panton-valentine leukocidin-positive and toxic shock syndrome toxin 1-positive methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: a French multicenter prospective study in 2008. Antimicrob Agents Chemother. 2011 Apr; 55(4): 1734-9.
81. Durand G, Bes M, Meugnier H, Enright MC, Forey F, Liassine N, *et al*. Detection of new methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* clones containing the toxic shock syndrome toxin 1 gene responsible for hospital- and community-acquired infections in France. J Clin Microbiol. 2006 Mar; 44(3): 847-53.

82. Robert J, Etienne J, Bertrand X; ONERBA (Observatoire National de l'Epidémiologie de la Résistance Bactérienne aux Antibiotiques). Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* producing Panton-Valentine leukocidin in a retrospective case series from 12 French hospital laboratories, 2000-2003. Clin Microbiol Infect. 2005 Jul; 11(7): 585-7.
83. Antri K, Rouzic N, Dauwalder O, Boubekri I, Bes M, Lina G, *et al.* High prevalence of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* clone ST80-IV in hospital and community settings in Algiers. Clin Microbiol Infect. 2011 Apr; 17(4): 526-32.
84. Otto M. Community-associated MRSA: what makes them special? Int J Med Microbiol. 2013 Aug; 303(6-7): 324-30
85. Tenover FC, Goering RV. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strain USA300: origin and epidemiology. J Antimicrob Chemother. 2009 Sep; 64(3): 441-6.
86. Li M, Diep BA, Villaruz AE, Braughton KR, Jiang X, DeLeo FR, *et al.* Evolution of virulence in epidemic community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. Proc Natl Acad Sci U S A. 2009 Apr 7; 106(14): 5883-8.
87. Kobayashi SD, DeLeo FR. An update on community-associated MRSA virulence. Curr Opin Pharmacol. 2009 Oct; 9(5): 545-51.
88. Georgopapadakou NH, Dix BA, Mauriz YR. Possible physiological functions of penicillin-binding proteins in *Staphylococcus aureus*. Antimicrob Agents Chemother. 1986 Feb; 29(2): 333-6.
89. Yang Y, Bhachech N, Bush K. Biochemical comparison of imipenem, meropenem and biapenem: permeability, binding to penicillin-binding proteins, and stability to hydrolysis by beta-lactamases. J Antimicrob Chemother. 1995 Jan; 35(1): 75-84.
90. Dumitrescu O, Choudhury P, Boisset S, Badiou C, Bes M, Benito Y, *et al.* Beta-lactams interfering with PBP1 induce Panton-Valentine leukocidin expression by triggering sarA and rot global regulators of *Staphylococcus aureus*. Antimicrob Agents Chemother. 2011 Jul; 55(7): 3261-71.
91. Pan A, Lorenzotti S, Zoncada A. Registered and investigational drugs for the treatment of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* infection. Recent Pat Antiinfect Drug Discov. 2008 Jan; 3(1): 10-33.
92. Micek ST. Alternatives to vancomycin for the treatment of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* infections. Clin Infect Dis. 2007 Sep 15; 45 Suppl 3: S184-90.
93. Otto MP, Martin E, Badiou C, Lebrun S, Bes M, Vandenesch F, *et al.* Effects of subinhibitory concentrations of antibiotics on virulence factor expression by community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. J Antimicrob Chemother. 2013 Jul; 68(7): 1524-32.

94. Dumitrescu O, Boisset S, Badiou C, Bes M, Benito Y, Reverdy ME, *et al.* Effect of antibiotics on *Staphylococcus aureus* producing Panton-Valentine leukocidin. *Antimicrob Agents Chemother.* 2007 Apr; 51(4): 1515-9.
95. Dumitrescu O, Badiou C, Bes M, Reverdy ME, Vandenesch F, Etienne J, *et al.* Effect of antibiotics, alone and in combination, on Panton-Valentine leukocidin production by a *Staphylococcus aureus* reference strain. *Clin Microbiol Infect.* 2008 Apr; 14(4): 384-8.
96. Diep BA, Afasizheva A, Le HN, Kajikawa O, Matute-Bello G, Tkaczyk C, *et al.* Effects of linezolid on suppressing in vivo production of staphylococcal toxins and improving survival outcomes in a rabbit model of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* necrotizing pneumonia. *J Infect Dis.* 2013 Jul; 208(1): 75-82.
97. Micek ST, Dunne M, Kollef MH. Pleuropulmonary complications of Panton-Valentine leukocidin-positive community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: importance of treatment with antimicrobials inhibiting exotoxin production. *Chest.* 2005 Oct; 128(4): 2732-8.
98. Rouzic N, Janvier F, Libert N, Javouhey E, Lina G, Nizou JY, *et al.* Prompt and successful toxin-targeting treatment of three patients with necrotizing pneumonia due to *Staphylococcus aureus* strains carrying the Panton-Valentine leukocidin genes. *J Clin Microbiol.* 2010 May; 48(5): 1952-5.
99. Herbert S, Barry P, Novick RP. Subinhibitory clindamycin differentially inhibits transcription of exoprotein genes in *Staphylococcus aureus*. *Infect Immun.* 2001 May; 69(5): 2996-3003.
100. Doss SA, Tillotson GS, Amyes SG. Effect of sub-inhibitory concentrations of antibiotics on the virulence of *Staphylococcus aureus*. *J Appl Bacteriol.* 1993 Aug; 75(2): 123-8.
101. Stevens DL, Ma Y, Salmi DB, McIndoo E, Wallace RJ, Bryant AE. Impact of antibiotics on expression of virulence-associated exotoxin genes in methicillin-sensitive and methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *J Infect Dis.* 2007 Jan 15; 195(2): 202-11.
102. Ohlsen K, Ziebuhr W, Koller KP, Hell W, Wichelhaus TA, Hacker J. Effects of subinhibitory concentrations of antibiotics on alpha-toxin (*hla*) gene expression of methicillin-sensitive and methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolates. *Antimicrob Agents Chemother.* 1998 Nov; 42(11): 2817-23.
103. Smith K, Gould KA, Ramage G, Gemmell CG, Hinds J, Lang S. Influence of tigecycline on expression of virulence factors in biofilm-associated cells of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob Agents Chemother.* 2010 Jan; 54(1): 380-7.

104. van Langevelde P, van Dissel JT, Meurs CJ, Renz J, Groeneveld PH. Combination of flucloxacillin and gentamicin inhibits toxic shock syndrome toxin 1 production by *Staphylococcus aureus* in both logarithmic and stationary phases of growth. *Antimicrob Agents Chemother.* 1997 Aug; 41(8): 1682-5.
105. Bernardo K, Pakulat N, Fleer S, Schnaith A, Utermöhlen O, Krut O, *et al.* Subinhibitory concentrations of linezolid reduce *Staphylococcus aureus* virulence factor expression. *Antimicrob Agents Chemother.* 2004 Feb; 48(2): 546-55.
106. Kernodle DS, McGraw PA, Barg NL, Menzies BE, Voladri RK, Harshman S. Growth of *Staphylococcus aureus* with nafcillin in vitro induces alpha-toxin production and increases the lethal activity of sterile broth filtrates in a murine model. *J Infect Dis.* 1995 Aug; 172(2): 410-9.
107. Joo HS, Chan JL, Cheung GY, Otto M. Subinhibitory concentrations of protein synthesis-inhibiting antibiotics promote increased expression of the agr virulence regulator and production of phenol-soluble modulins in community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob Agents Chemother.* 2010 Nov; 54(11): 4942-4.
108. Yamaki J, Synold T, Wong-Beringer A. Antivirulence potential of TR-700 and clindamycin on clinical isolates of *Staphylococcus aureus* producing phenol-soluble modulins. *Antimicrob Agents Chemother.* 2011 Sep; 55(9): 4432-5.
109. Pfaffl MW, Horgan GW, Dempfle L. Relative expression software tool (REST) for group-wise comparison and statistical analysis of relative expression results in real-time PCR. *Nucleic Acids Res.* 2002 May 1; 30(9): e36.
110. The European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing. Breakpoint tables for interpretation of MICs and zone diameters. Version 4.0, 2014. <http://www.eucast.org>

L'ISPB - Faculté de Pharmacie de Lyon et l'Université Claude Bernard Lyon 1 n'entendent donner aucune approbation ni improbation aux opinions émises dans les thèses ; ces opinions sont considérées comme propres à leurs auteurs.

BERAUD Laetitia

Etude de l'influence des antibiotiques à concentrations sub-inhibitrices sur l'expression des PSM α chez *Staphylococcus aureus*

Th. D. Pharm., Lyon 1, 2014, 109p.

RESUME

Staphylococcus aureus est responsable d'une grande variété d'infections. Les SARM (*S. aureus* résistant à la méticilline) produisent différents facteurs de virulence, dont les "Phenol-Solubles Modulines α " (PSM α). Certains antibiotiques anti-staphylococciques sont connus pour moduler l'expression de ces facteurs de virulence. Dans cette étude, nous nous sommes intéressés à l'impact de concentrations sub-inhibitrices d'antibiotiques sur l'expression des PSM α par les SARM.

Nous avons sélectionné 4 souches cliniques de SARM issues de 2 fonds génétiques différents que nous avons incubées avec des concentrations sub-inhibitrices de huit antibiotiques différents : tigécycline, clindamycine, linézolide, oxacilline, imipénème, vancomycine, rifampicine et ofloxacine. Après 6 heures d'incubation, l'expression des ARNm PSM α 1/2 et PSM α 3 a été quantifiée par qRT-PCR alors que celle des toxines PSM α 1/2 et PSM α 3 a été effectuée après 6 heures et 24 heures d'incubation par HPLC-MS.

La présence de tigécycline et de clindamycine a augmenté les taux d'ARNm PSM α . Le dosage protéique des PSM α a également présenté une augmentation après 6 heures de traitement par ces antibiotiques, augmentation non retrouvée ou faiblement présente après 24 heures de culture. Le linézolide n'a pas entraîné de variation significative de l'ARNm PSM α mais une augmentation du dosage protéique après 6 heures de culture bactérienne. Les β -lactamines ont été responsables d'un effet variable souche-dépendant après 6 heures et d'une augmentation globale après 24 heures de culture bactérienne. La vancomycine, la rifampicine et l'ofloxacine n'ont pas modifié l'expression des PSM α .

L'augmentation des ARNm PSM α par la tigécycline et la clindamycine peut être reliée à un effet de ces antibiotiques sur le système de régulation Agr. Néanmoins, nos résultats, à l'opposé des effets des antibiotiques sur les autres toxines, suggèrent un mécanisme nouveau indépendant de l'effecteur ARNIII. Les modifications observées sur les dosages protéiques de PSM α sont plus complexes, et mettent en jeu l'inhibition de la synthèse protéique propre à ces antibiotiques. Les variations d'ARNm PSM α en présence de β -lactamines ne permettent pas de conclure à une action de ces antibiotiques sur la régulation globale. L'évolution de la quantité de peptides présents dans le milieu, lors d'une incubation avec l'oxacilline ou l'imipénème, laisse supposer une action post-transcriptionnelle de ces antibiotiques. En réponse à l'action des β -lactamines sur la paroi, la bactérie pourrait diminuer sa production d'auréolysine, système de dégradation des PSM α , favorisant ainsi l'accumulation de ces peptides. Nos résultats montrent un effet modulateur des antibiotiques sur l'expression de PSM α ayant un possible impact sur l'évolution des infections staphylococciques impliquant ces toxines.

MOTS CLES

Staphylococcus aureus, Phenol-Solubles Modulines α (PSM α), Antibiotiques

JURY

Président	M. le Professeur Jean FRENEY
Membres	Mme le Docteur Oana DUMITRESCU
	M. le Professeur Gérard LINA
	M. le Docteur Jean-Paul STEGHENS
	M. le Professeur François VANDENESCH

DATE DE SOUTENANCE

Vendredi 14 mars 2014

ADRESSE DE L'AUTEUR

5, Rue des Marronniers – 69002 LYON